

JULIANA HELENA PAMPLONA

**CONSTRUÇÃO DE LINHAGENS ESTÁVEIS DE CÉLULAS
MESANGIAIS DE CAMUNDONGO EXPRESSANDO DIFERENTES
SISTEMAS TRANSCRITORES DA VIA DE SINALIZAÇÃO DO TGFB**

Monografia apresentada como requisito parcial
à obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biológicas, Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Dr. Stéphane Illiano
Co-Orientadora: Prof^a Dra. Célia Regina
Cavichiolo Franco

**CURITIBA
2007**

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

RÉSUMÉ

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO.....	12
1.1 A FIBROSE RENAL E A DIABETES.....	12
1.2 O GLOMÉRULO RENAL E A MATRIZ EXTRACELULAR.....	12
1.3 O TGFB.....	13
1.4 A ANGIOTENSINA.....	15
2 OBJETIVOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 CÉLULAS MESANGIAIS DE CAMUNDONGO E HUMANAS/ CULTIVO CELULAR.....	17
3.2 ANÁLISE EM WESTERN BLOT.....	18
3.2.1 Eletroforese.....	19
3.2.2 A transferência.....	19
3.2.3 Imunomarcção.....	20
3.3 A TRANSFECCÃO.....	20
3.4 AS LINHAGENS ESTÁVEIS.....	21
3.5 OS VETORES.....	22
3.5.1 Smad e Smad ³ / ₄	22
3.5.2 O phTG 1/10 e PhTG 4/10.....	22
3.5.3 A higromicina.....	23
3.5.4 O inibidor do TGFβ.....	23
3.6 PARÂMETROS ANALISADOS.....	23
4 RESULTADOS.....	24
4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRANSFECCÃO.....	24
4.2 PADRONIZAÇÃO DA TRANSFECCÃO COM O GENE CRE_LUC.....	25
4.3 LINHAGENS ESTÁVEIS SMAD.....	26

4.3.1	Resultados das experiências em transfecção transitória.....	26
4.3.2	Resultados com as linhagens estáveis.....	29
4.4	LINHAGEM ESTÁVEL PHTG 4/10.....	33
4.4.1	Resultados das experiências em transfecção transitória.....	34
4.4.2	Resultados com as linhagens estáveis.....	36
4.5	INIBIÇÃO DOS CLONES SMAD E PHTG 4/10 PELO SB431542.....	41
4.6	ATIVAÇÃO DE SMAD PELO TGFB EM CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS.....	42
5	DISCUSSÃO.....	44
	REFERÊNCIAS.....	46
	ANEXOS.....	49

AGRADECIMENTOS

A minha família, pela oportunidade de ter tido esta experiência fora do país, e pela sua forte presença e amor em todos os momentos em que estive fora.

A Michèle e Christian Bouloy. A Michèle agradeço pelo aprendizado das técnicas laboratoriais, e a ambos pela amizade, por terem tornado meus momentos na França muito mais tranquilos e especiais.

Ao Beto, pelo companheirismo, carinho, paciência.

Ao Dr. Stéphane Illiano, pela confiança e oportunidade.

A Professora Célia Regina, por compartilhar seu conhecimento e por seus conselhos.

RESUMO

A fibrose é um depósito em excesso de colágeno tipo I e III, um acúmulo de matriz extracelular seguida por uma superexpressão de proteínas matriciais, como resposta a um processo de necrose ou apoptose. As diabetes de tipo 1 e 2 são uma das principais doenças que levam a disfunções renais e o acúmulo de matriz mesangial e o espessamento da membrana basal dos glomérulos (conjunto de capilares anastomosados e células endoteliais, epiteliais e mesangiais) sendo estas as primeiras alterações estruturais da nefropatia diabética. O TGF β é um polipeptídeo, protótipo da super família do TGF β , estocado na matriz extracelular sob forma de complexo latente. O TGF β estimula a síntese e/ou inibição da degradação da matriz extracelular. Ele possui 2 receptores do tipo I e II serina/treonina quinases; o receptor tipo II quando ligado ao seu ligante fosforila o receptor I, que favorece a ligação de fatores de transcrição, como as proteínas SMAD, as quais são substratos dos receptores do TGF β . As pesquisas que enfocam as moléculas inibidoras das vias de sinalização do TGF β , como as proteínas SMADs, ou inibidoras de um de seus receptores, fundamental na pesquisa de patologias associadas à fibrose foram empregadas para este trabalho. Neste trabalho empregamos como ferramenta de investigação linhagens estáveis que permitem a análise da resposta ao TGF β com a ajuda de um vetor ligado aos elementos de resposta SMAD (estas foram construídas e caracterizadas) empregando-se células mesangiais de camundongo. Outra linhagem foi construída em paralelo com o vetor pH4/TGF β , o pH4/TGF β sendo o promotor do TGF β humano. As repostas ao tratamento ao TGF β foram analisadas após transfecção transitória ou transfecção estável. Nos dois casos, observou-se uma resposta dependente da concentração. O TGF β estimulou a transcrição na linhagem SMAD com uma EC₅₀ de 0,7 ng/ml, e uma EC₅₀ de 0,1 ng/ml na linhagem pH4/TGF β . As duas linhagens foram em seguida submetidas ao tratamento com um inibidor do receptor do tipo I do TGF β , o SB431542. Esta molécula inibe a ativação do TGF β com uma IC₅₀ de 1,3 μ M nas linhagens estáveis SMAD, e com uma IC₅₀ de 0,2 μ M nas linhagens pH4/TGF β . Em paralelo, para confirmar estes resultados, foi realizada análise em Western Blot da fosforilação de SMAD pelo TGF β e validações com produtos de referência foram realizadas sobre culturas primárias de células mesangiais humanas. Foi observada então uma estimulação da fosforilação de SMAD 3 de maneira transitória

pelo TGF β em um tempo máximo curto de ativação de 15 minutos, e uma inibição da mesma atividade pelo inibidor SB431542, observada nas células mesangiais de camundongo.

RÉSUMÉ

La fibrose est un dépôt en excès de collagène type I et III, une accumulation de matrice extracellulaire suite à une surexpression de protéines matricielles, comme réponse à un processus de nécrose ou d'apoptose. Les diabètes de type 1 et 2 sont une des principales dysfonctions rénales, et l'accumulation de matrice mésangiale et l'épaississement de la membrane basale des glomérules (ensemble de capillaires anastomosés et des cellules endothéliales, épithéliales et mésangiales) sont les premières altérations structurales de la néphropathie diabétique. Le TGF β est un polypeptide, prototype de la super famille du TGF β , stocké dans la matrice extracellulaire sous forme de complexe latent. Le TGF β stimule la synthèse et l'inhibition de la dégradation de la matrice extracellulaire. Il a 2 récepteurs de type I et de type II, serine/threonine kinases ; le récepteur II lié au ligand phosphoryle le récepteur I, qui favorise la liaison et phosphorylation de facteurs de transcription, comme les protéines SMAD, substrats des récepteurs du TGF β . La recherche de petites molécules inhibant les voies de signalisation du TGF β , comme les SMADs, ou inhibant un de ses récepteurs (2 outils utilisés dans ce stage) est fondamental dans la recherche de pathologies associées à la fibrose. Dans ce stage, des lignées stables permettant l'analyse de la réponse au TGF β à l'aide d'un gène rapporteur couplé aux éléments de réponse SMAD ont été construites et caractérisées, dans une lignée de cellules mésangiales de souris. Une lignée avec le vecteur pH4.10, le pH4.10 étant le promoteur du TGF β humain a été construite en parallèle. Les réponses au traitement TGF β ont été analysées après transfection transitoire ou transfection stable. Dans les deux cas, on observe une réponse dépendante de la concentration. Le TGF β stimule la transcription dans la lignée SMAD avec un EC₅₀ de 0,7ng/ml, et un EC₅₀ de 0,1ng/ml dans la lignée pH4.10. Les deux lignées ont ensuite été soumises au traitement avec l'inhibiteur du récepteur de type I du TGF β , le SB431542. Cette molécule inhibe l'activation du TGF β avec un IC₅₀ de 1,3 μ M dans les lignées stables SMAD, et avec un IC₅₀ de 0,2 μ M dans les lignées stables PHTG 4/10. En parallèle, pour confirmer ces résultats des mesures en Western Blot de phosphorylation de SMAD par le TGF β et des validations avec des produits de référence, ont été réalisées sur des primo-cultures de cellules mésangiales humaines.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema da transcrição SMAD.....	06
Figura 2: Esquema do plasmídeo Translucent.....	14
Figura 3: Fotografia de células Mes13 de camundongo transfectadas com 1 µg de GFP.....	16
Figura 4: Resposta funcional da forskolina sobre as células mesangiais de camundongo com dois protocolos de transfecção.....	17
Figura 5: Resposta proporcional da forskolina de células Mes13 transfectadas com o gene Cre-luc de acordo com dois protocolos.	18
Figura 6: Células Mes13 transfectadas com um reporter SMAD, tratadas com TGF-β (n=3).	19
Figura 7: Células Mes13 transfectadas com um reporter SMAD 3/4, tratadas com TGF-β e Angiotensina II (n=2).....	19
Figura 8: Efeito do TGF-β sobre a ativação do reporter SMAD em células Mes13 testadas em transfecção transitória ou na linhagem « policlonal ».....	20
Figura 9: Inibição pelo SB431542 da ativação de SMAD induzida pelo TGFβ (20ng/ml) após transfecção transitória em células Mes13 (n=3).....	21
Figura 10: Resposta do clone nº1 ao tratamento com TGFβ.	23
Figura 11: Resposta do clone nº2 ao tratamento com TGFβ.	23
Figura 12: Resposta do clone nº3 ao tratamento com TGFβ.	24
Figura 13: Resposta do clone nº4 ao tratamento com TGFβ.	24
Figura 14: Efeito do SB431542 sobre a ativação do reporter SMAD induzido por 20ng/ml de TGFβ no clone 2 de Mes13 (n=1).....	25
Figura 15: Esquema do promotor do TGFβ humano.....	26
Figura 16 : Células Mes13 transfectadas com um vetor phTG1/10 e phTG4/10, tratadas ao TGFβ, Angiotensina II e forskolina.	27
Figura 17: Células Mes13 em transfecção transitória com o vetor phTG 4/10, tratadas com Angiotensina II.	28
Figura 18: Células transfectadas com o vetor phTG 4/10 e tratadas ao TGFβ e à Angiotensina II.	29
Figura 19: Estimulação de células transfectadas com vetor phTG 4/10 pelo TGFβ (20 ng/ml).	31

Figura 20: Reposta do clone nº 2 ao tratamento TGF β	32
Figura 21: Reposta do clone nº 3 ao tratamento TGF β	32
Figura 22: Reposta do clone nº 13 ao tratamento TGF β	33
Figura 23: Reposta do clone nº 17 ao tratamento TGF β	33
Figura 24: Inibição pelo SB431542 da resposta ao TGF β sobre os clones SMAD e phTG 4/10 (n=2).....	34
Figura 25: Western-Blot PhosphoSMAD3.	35
Figura 26: Western-Blot PhosphoSMAD3. Tratamento TGF β 20ng/ml + gama do inibidor SB431542.	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferentes níveis de base de clones SMAD testados ao TGF β 20ng/ml.....	22
Tabela 2: Diferentes níveis de base dos clones testados com Angiotensina II (10 μ M).....	30
Tabela 3: Tratamento em gama Angiotensina II.....	30

1. INTRODUÇÃO

1.1 A FIBROSE RENAL E A DIABETES

A fibrose é um acúmulo em excesso de colágenos tipos I e III, que substituem os tecidos após morte celular tanto por ação da necrose ou apoptose. É um processo de reparação e cicatrização de lesões ligadas à produção e secreção de citocinas, migração de macrófagos e ativação de fibroblastos. No caso de patologias crônicas, este fenômeno aumenta e causa a produção excessiva de matriz extracelular. As diabetes de tipo 1 e 2 estão relacionadas com as principais disfunções renais: de 10 a 21% dos diabéticos têm como complicação frequente uma nefropatia (ZHOU, 2004). O acúmulo de matriz mesangial e o espessamento da membrana basal dos glomérulos são as primeiras alterações estruturais desta nefropatia. Estas mudanças são acompanhadas do aumento da permeabilidade da membrana basal dos glomérulos às proteínas, resultando em um aumento da excreção de albumina na urina (NIEUWENHOVEN, 2004) e uma modificação na taxa de filtração glomerular. O número de pacientes diabéticos, especialmente de tipo 2, aumenta com o tempo e tornou-se um problema social. Entre as complicações ligadas à diabetes, a nefropatia é a principal, pois necessita de diálise e/ou transplante nas fases mais avançadas. Nos EUA, 40% dos pacientes que sofrem diálise são diabéticos (ZHOU, 2004).

1.2 O GLOMÉRULO RENAL E A MATRIZ EXTRACELULAR

O glomérulo renal filtra o sangue, retém os elementos celulares sanguíneos e as proteínas plasmáticas, que são devolvidos à circulação a partir de diferentes etapas de reabsorção no rim. Este filtrado é a primeira etapa da formação da urina.

Cada glomérulo é constituído de capilares envolvidos em uma cápsula (cápsula de Bowman), constituída de células epiteliais e matriz extracelular. As células endoteliais que constituem os capilares são envolvidas pela matriz extracelular e por três tipos celulares: células epiteliais, fibroblastos e células mesangiais. As células mesangiais possuem receptores para uma grande variedade de hormônios e fatores de crescimento e secretam citocinas ($IL1\beta$, $TNF\alpha$, prostaglandinas, IFN- α), mediadores inflamatórios e imunes. Elas modificam após contração ou relaxamento, atuam na superfície dos capilares e modulam a

taxa de filtração glomerular. Sintetizam a matriz extracelular e permitem a manutenção de sua estrutura e assim, estabilizam a barreira de filtração do glomérulo (LIU, 2006).

A matriz extracelular glomerular é constituída principalmente de colágeno IV, laminina, proteoglicano de heparan sulfato, fibronectina e nidogênio (ORTEGA-VELAZQUEZ, 2004). A fibronectina é uma glicoproteína que conecta a estrutura não-contrátil da membrana basal glomerular, a matriz extracelular e ao aparelho contrátil das células mesangiais. A laminina é também uma glicoproteína envolvida na adesão, migração e diferenciação celular. O nidogênio (entactina) é uma glicoproteína sulfatada implicada nas interações da laminina com outras proteínas de matriz. O colágeno de tipo IV não forma fibras : é secretado sob forma de pró-colágeno. É constituído de duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$ e contém um domínio específico 7S. Ele se organiza em rede tridimensional pela interação de domínios C e N terminais de diferentes cadeias e por associações laterais.

1.3 O TGF β

O TGF β é um polipeptídeo secretado sob forma de complexo latente que necessita de uma clivagem por proteases (ex. plasmina) para gerar sua forma ativa, a qual é capaz de ligar-se a seus receptores. Esta forma latente consiste de um dímero ativo de TGF β ligado de maneira não covalente à outras proteínas que permitem sua estocagem na matriz extracelular. Esta matriz pode assim servir de reservatório de TGF β , que pode então ser liberado rapidamente para as células em caso de necessidade.

O TGF β é o protótipo da super família do “TGF β ”, capaz de agir sobre numerosos tipos celulares. O TGF β estimula a síntese e/ou inibição da degradação da matriz extracelular e modula a expressão de receptores da mesma matriz. A formação do complexo ligante-receptor do TGF β consiste de dois receptores do tipo I e do tipo II que são receptores do tipo serina/treonina quinases. Existem 5 receptores do tipo II de mamíferos (T β R-II, ActR-II, ActR-IIB, BMPR-II et AMHR-II) e 7 receptores do tipo I (ALKs 1-7). Após ligação do ligante sob a forma de dímero (MASSAGUÉ *et al.*, 2000), o receptor de tipo II tem acesso à região GS, uma região rica em treonina/serina no receptor de tipo I e catalisa a fosforilação de resíduos de serina ou treonina (ATTISANO, 1998). Esta fosforilação do receptor do tipo I favorece então a ligação e fosforilação de fatores de transcrição, os Smads (HUSE *et al.* 2001). Somente 5 Smads 1, 2, 3, 5 e a 8 de mamíferos agem como substratos de receptores do TGF β , são designados como receptores-reguladores SMAD, ou RSMAD (MASSAGUÉ,

2005). SMADs 1, 5 e 8 são substratos para ALKs 1, 2, 3 e 6, enquanto SMADs 2 e 3 são substratos para ALKs 4, 5 e 7 (PIEK *et al.*, 1999). Em resposta ao TGF β ou às BMP (Bone Morphogenetic Protein) os Smads se acumulam no núcleo e ativam genes alvo destas duas citocinas (HOODLESS *et al.* 1996 ; LIU *et al.* 1996). Em vários tipos celulares a resposta ao TGF β se transmite à partir da combinação de T β R-II e ALK5 (PIEK *et al.*, 1999). Pequenas moléculas que inibem de maneira seletiva os receptores tipo quinase dos membros da super família do TGF β podem ser muito úteis na compreensão de mecanismos de sinalização e para determinar em quais processos biológicos eles estão implicados. É o caso do inibidor do receptor ALK5 (« activin receptor-like kinase ») do TGF β , o SB431542. O SB431542 é um competidor de ATP no sítio kinase e inibe a fosforilação *in vitro* de SMAD 3 (CALLAHAN *et al.*, 2002).

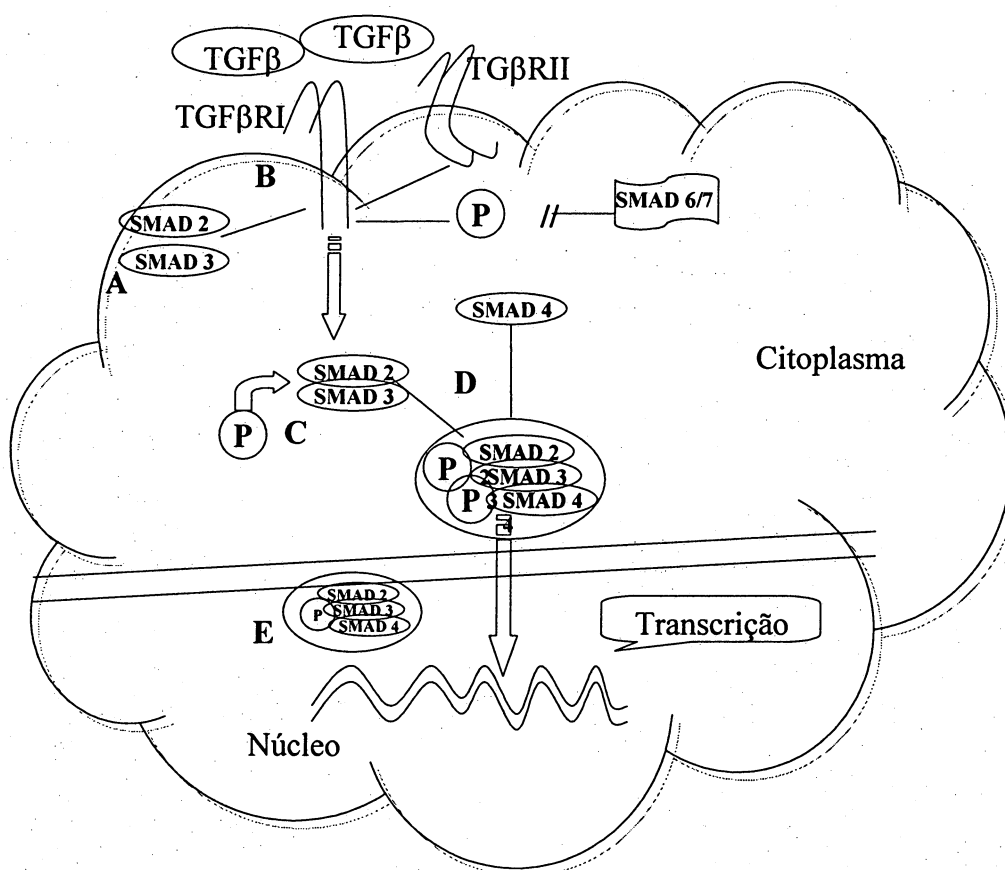


Figura 1: Esquema da transcrição SMAD. OS R-SMADs no citoplasma (A) são recrutados pelos receptores de TGF β (B) e então são fosforilados pelos mesmos receptores (C). Em seguida, um complexo é formado com SMAD 4 e transportado ao núcleo. Este complexo regula a transcrição de genes alvo do TGF β (E).

1.4 A ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina-aldosterona regula o volume extracelular, o balance de água e sódio e a atividade cardiovascular. A renina é uma enzima que cliva o angiotensinogênio sintetizado no fígado e forma a angiotensina I, que será transformada em angiotensina II pela ACE (angiotensine-converting enzyme). A angiotensina II estimula a proliferação celular, a inflamação e a fibrose. Em diferentes tipos celulares, a angiotensina estimula a expressão do TGF β que serve de mediador a várias respostas induzidas inicialmente pela angiotensina II (RODRÍGUEZ-VITA *et al.*, 2005). A angiotensina II possui dois receptores específicos, os receptores AT1 e AT2. O primeiro está implicado nas ações hemodinâmicas, endócrinas e nos efeitos mitogênicos da angiotensina II. O segundo está implicado no desenvolvimento do feto. Alterações desta cascata hormonal por acúmulo de angiotensina II provoca patologias renais (BREWSTER *et al.*, 2004). Isto se traduz clinicamente por uma proteinúria e nefropatias em diabéticos e não-diabéticos. Estes efeitos podem ser inibidos com a ajuda de antagonistas específicos do receptor AT1 ou também em modelos animais por inibidores da ativação do TGF β . Assim, a angiotensina tem um papel importante na evolução de patologias renais especialmente através destes efeitos sobre a expressão e secreção de TGF β pelas células renais.

2. OBJETIVOS

Este trabalho foi realizado no contexto da Bioquímica cardiovascular do grupo Sanofi aventis, em Chilly Mazarin, França (Anexo1). Assim, na área das questões anti-fibróticas renais e cardíacas, o objetivo deste trabalho foi a construção e a caracterização de linhagens celulares estáveis permitindo a análise da resposta o $TGF\beta$ com a ajuda de um gene vetor ligado aos elementos de resposta SMAD. Com o objetivo de um “screening” fenotípico, este sistema empregou o desenvolvimento de uma linhagem em células mesangiais de camundongo. Em paralelo, medidas de ativação do $TGF\beta$ e de validação com produtos de referência foram efetuadas sobre cultura primária de células mesangiais humanas para confirmar a especificidade dos resultados obtidos com as células mesangiais de camundongo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CÉLULAS MESANGIAIS DE CAMUNDONGO E HUMANAS/ CULTIVO CELULAR

Foram utilizadas as células mesangiais de camundongo (Linhagem Mes13 adquiridas da ATCC- American Type Culture Collection, lotes de cultura recebidos na 14^a passagem (P14). As células mesangiais humanas foram adquiridas da Sociedade Cambrex Bioscience, (lote OF1581), recebidas na 3^a passagem e criopreservadas em nitrogênio líquido à -196°C. Elas são utilizadas até a passagem 10.

O meio de cultura MsBM- Mesangial Cell Basal Medium foi fornecido pela Sociedade Cambrex Bioscience, enriquecido com antibióticos (amfotericina B e gentamicina) para prevenir contaminações por procariotos. Para assegurar a proliferação das células, 25 ml de soro fetal bovino- FBS, (Fetal Bovine Serum da Gibco Life Technologies, Rockville, MD, EUA) foram adicionados à 500 ml (mililitros) de meio de cultura. As células foram mantidas em frascos (Costar® Cell Culture Flask) de 225 cm² ou em placas da Corning® Costar® Co. (Cambridge, MA, EUA) de 6, 12 ou 96 poços de poliestireno ou policarbonato para posterior tratamento e impostas a diferentes ensaios.

O descongelamento celular foi feito a partir de criotubos a 500.000 células/ml. O volume celular foi resuspenso em um ml e meio de meio de cultura, adicionado em um frasco de 750 cm² mantido em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após as 24 horas de manutenção em estufa de CO₂, trocou-se o meio das células aderidas.

Ao atingirem a sub-confluência (em torno de 6 a 7 dias em estufa de CO₂), as células foram expandidas para frasco T225. Previamente foram impostas a 3 lavagens com DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, D-PBS) 10X, da Gibco (Life Technologies, Rockville, MD, EUA) para retirar as células mortas e os “debris” celulares. Empregou-se 5 ml de tripsina - Trypsin/EDTA Solution da Gibco (Life Technologies, Rockville, MD, EUA) por 5 minutos a 37°C para soltar as células. Posteriormente, as submetemos à neutralização da tripsina adicionando 10 ml de meio contendo soro fetal bovino.

Após, as células foram impostas a centrifugação (1.400 giros) por 5 minutos. O sobrenadante foi aspirado, e o pellet celular resuspenso em meio de cultura.

Para contagem celular empregou-se lâmina de Malassez, posteriormente ao emprego do ensaio de Viabilidade celular pelo método de exclusão do azul de Tripan. A lâmina de Malassez permite a numeração dos elementos observáveis ao microscópio, possuindo uma região central apresentando divisões em quadrados de 50µm de lado. Para a realização dos posteriores ensaios as células foram utilizadas até a 10ª passagem. Para tanto cada sub-cultivo realizado corresponde a uma nova passagem celular.

Para os diferentes ensaios as células foram plaqueadas em placas 96 poços à uma densidade de 10.000 ou 20.000 células por poço em 100 µl de meio. Após 24 horas em estufa de CO₂, estas foram submetidas aos diferentes tratamentos de interesse: o meio foi aspirado e incubadas com meio contendo 0,1% de soro e a concentração de TGFβ desejada, para o teste. Após 48 horas, as placas contendo as células foram impostas à leitura em um luminômetro TOP COUNT (TopCount from PerkinElmer-USA).

Antes da leitura, o substrato da luciferase, a luciferina, BrightGlo Luciferase Assay System (da Promega Corporation) foi adicionado às células, o que permite medir a atividade da luciferase expressa pelas células transfectadas.

Para as análises em Western Blot, as células foram plaqueadas em placas de 6 poços à uma densidade de 30.000 células por poço em meio completo. Após 48 horas de cultivo as células foram tratadas em meio contendo 0,1 % de soro. Após 24 horas de incubação promoveu-se a lise celular (tampão de lise “Cell Lysis Solution” IX, Promega Corporation) e submeteu-se a amostra à análise em Western Blot.

3.2 ANÁLISE EM WESTERN BLOT

Empregou-se a análise em Western Blot para mensurar as diferenças de expressão de uma proteína específica entre diferentes amostras biológicas. 24 horas após o tratamento, as células foram lavadas com DPBS, lisadas com tampão de lise, e colocadas em tubos tipo eppendorf. A padronização da dosagem foi realizada com o método BC Assay Protein Quantitation Kit (Uptima, Interchim, França). A curva foi preparada com diferentes concentrações de proteína (BSA Standard, Albumina bovina sérica. O padrão e as amostras (diluídas à ¼ em água) foram colocadas em placas 96 poços, em triplicata, com os reagentes ácido bicinoninico mais sulfato. Estes permitem determinar a concentração protéica por

espectrofotometria através de uma reação química colorimétrica que consiste na redução dos íons Cu^{2+} a íon Cu^+ pelas ligações peptídicas presentes nas proteínas. Tanto os reagentes, bem como a BSA, são de Uptima, Interchim.

A reação foi mensurada por leitura da absorbância, em um espectrofotômetro da Hewlett-Packard, do complexo Cu^+ a um comprimento de onda de 562 nm. A absorbância é diretamente proporcional à concentração protéica. Após a dosagem protéica, as amostras foram padronizadas à mesma concentração, para permitir em seguida aplicação destas em Western Blot.

As amostras foram reduzidas com tampão de Laemmli - NuPAGE® LDS Sample Preparation Buffer e DTT (NuPAGE® Reducing Agent) ambos de NuPAGE®, Invitrogen. As amostras foram aquecidas por 10 minutos à temperatura de 90°C, para desnaturar as proteínas.

3.2.1 Eletroforese

As amostras desnaturadas e carregadas negativamente pelo tampão de Laemmli foram aplicadas sobre o gel de migração, submetido a um campo elétrico, o que permite a migração das proteínas para o ânodo (pólo positivo). A amperagem, voltagem e tempo de migração dependem do gel e do tamanho das proteínas. As proteínas maiores migram mais lentamente e ficam no alto do gel. O gel foi escolhido de acordo com o tamanho das proteínas: para aquelas que possuem um alto peso molecular, gel Tris-Acetato 3-8% (NuPAGE® Tris-Acetate) e tampão Tris-Acetato SDS (NuPAGE® MES Running Buffer). Para aquelas tendo um baixo peso molecular, gel Bis-Tris 10% (NuPAGE® Bis-Tris) e tampão MOPS SDS (NuPAGE® MOPS Running Buffer). Foram aplicadas simultaneamente às amostras um marcador de peso molecular (MagicMark™ XP Western Protein Standard, Invitrogen™) e um marcador colorido (MultiMark™ Multi-Colored Standard, Invitrogen™).

3.2.2 A transferência

As proteínas foram transferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose (Invitrogen™). Para visualização das proteínas transferidas, a membrana de nitrocelulose foi corada com Vermelho de Ponceau.

3.2.3 Imunomarcção

Para a realização da imunomarcção, as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose, primariamente a membrana foi saturada com leite 5% (Blotting-grade Blocker non-fat dry milk), da Bio-Rad Laboratories, em TBS-Tween (Tris Buffered Saline-Tween 0,1%, Bio-Rad Laboratoires) por uma hora. A membrana foi posteriormente incubada por 16h sob agitação à 4°C à temperatura ambiente, com anticorpo policlonal anti SMAD 3 humano o qual reconhece resíduos de serina 423 e 425 de, produzido em coelho, adquirido comercialmente da empresa Cell Signaling. Empregamos também o anticorpo monoclonal anti- actina produzido em camundongo adquirido da (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Após as incubações, submetemos a 4 lavagens de 10 minutos com TTBS (TBS-Tween). A membrana foi posteriormente incubada com o anticorpo secundário acoplado à Peroxidase (HRP- Horseradish Peroxydase) anti-IgG de coelho para o anticorpo policlonal anti SMAD 3 (Amersham Pharmacia) ou anti-IgG de camundongo para o anticorpo monoclonal anti- actina (Amersham Pharmacia), e incubada por 1 hora sob agitação à temperatura ambiente. Após as lavagens em TTBS depois em TBS (Tris Buffered Saline) as membranas foram reveladas com ECL (Amersham Biosciences), que é o substrato quimioluminescente da Peroxidase. O luminol do ECL (Enzyme Chemiluminescence) quimoxidado pela peroxidase liberou fótons no local onde se depositaram as proteínas (impostas ao seu perfil eletroforético).

3.3 A TRANSFECCÃO

O aparelho AMAXA permite uma transfecção do plasmídeo diretamente dentro do núcleo, à partir de soluções específicas. A transfecção foi realizada por eletroporação com a « Nucleofector Solution », que facilita a inserção do DNA, neutralizando suas cargas negativas. AMAXA propõe vários protocolos específicos para diferentes tipos celulares: cada um a uma voltagem, uma amperagem, e uma duração específicas. Um milhão de células foram transfectadas à temperatura ambiente com 100µl de Nucleofector Solution. Após transfecção 500µl de meio de cultura à (37°C) foram adicionados para estabilizar as células que foram em seguida distribuídas em placa a uma densidade desejada. Para a padronização das condições de transfecção, testes iniciais para a escolha do protocolo foram realizados,

tanto com a GFP (Green Fluorescent Protein), plasmídeo pmaxGFPTM, de Nucleofector Technology e analisados em Microscopia Óptica de Fluorescência, tanto com o gene Cre_Luc. Este último contém os elementos de resposta CRE, e permite uma caracterização funcional das células quando submetidas ao tratamento à forskolina, visto que esta estimula via adenilato ciclase a ativação destes elementos de transcrição.

3.4 AS LINHAGENS ESTÁVEIS

As células mesangiais de camundongo (Mes13) foram utilizadas para criar as linhagens estáveis. Estas células foram ideais para tal propósito, por se proliferarem rapidamente, ao contrário das Células mesangiais humanas.

Um milhão de células foram transfectadas com o vetor de interesse e o vetor de seleção contendo o gene de resistência à higromicina. A razão do vetor de interesse para o de seleção foi de 10/1. As células foram cultivadas em meio de cultura apropriado por 2 dias, em seguida, cultivadas em meio contendo antibiótico de seleção higromicina, adquirida comercialmente de Promega, e utilizada à 200µg/ml. Tal estratégia permite selecionar as células que foram transfectadas, e resistentes à higromicina. Estas então foram cultivadas em frasco em presença deste meio de seleção. Uma semana após elas foram plaqueadas em placas 96 poços, com diferentes substâncias que estimulam o vetor. Para tanto, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços em três concentrações diferentes: 0,3 ; 0,6 e 1 célula por poço (3, 6 e 10 células/ml). 4 placas foram empregadas para cada diluição, e incubadas à 37°C, 5% CO₂ por 15 dias. Os poços contendo visualmente apenas um clone foram subcultivados: lavados em DPBS, com 50µl de tripsina em placas 24 poços, onde imediatamente foi adicionado 750µl de meio de cultura contendo higromicina. 5 dias após, os clones foram impostos novamente a 100µl de tripsina, e testados. Este teste consiste de tratamento com TGFβ, na concentração de 20 ng/ml de TGFβ. Os clones que apresentam resposta positiva ao tratamento TGFβ em relação ao controle são selecionados. Para neutralizar a tripsina, 200µl de meio de cultura com soro fetal bovino foi adicionado. A metade deste volume total foi colocado em placas 24 poços, e a outra metade foi distribuída em 4 poços de uma placa 96 poços. Estes foram testados no dia seguinte, com meio contendo 0,1% de soro. Estes testes permitem escolher os clones positivos. Os clones escolhidos foram sub-cultivados e contados, e uma coluna inteira de uma placa 96 poços foi preenchida com cada clone à 10.000 células por poço. No dia seguinte, estes foram testados com as proteínas

de interesse. Os clones positivos foram selecionados e amplificados. O TGF β utilizado no tratamento das células transfectadas foi adquirido de R&D Systems, USA.

3.5 OS VETORES :

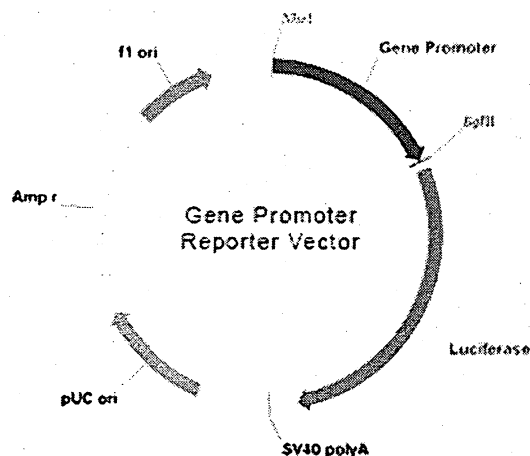


Figura 2: Esquema do plasmídeo Translucent, de Panomics, expressando o gene da luciferase.

3.5.1 Smad e Smad $\frac{3}{4}$

As proteínas Smad são fosforiladas pelos receptores do TGF β permitindo a sinalização intracelular do mesmo. Os vetores utilizados neste estudo foram o pSmad-luc e o pSmad $\frac{3}{4}$ -luc, que possuem como vetores hospedeiros o pTranslucent de Panomics. O pSMAD possui as sequências de nucleotídeos AGTATGTCTAGACTGA repetidas 3 vezes e o segundo a sequência inteira TCGAGAGCCAGACAAAAAGCCAGACATTTAGCAGACAC clonados antes do gene da luciferase.

3.5.2 O phTG 1/10 e phTG 4/10

Os plasmídeos phTG são plasmídeos PGL3 basic (Promega), onde o promotor do TGF β humano foi clonado a montante de um gene “reporter”, a luciferase. O vetor phTG 1/10

expressa a sequência completa do promotor TGF β (–1362 /+242), o phTG 4/10 a sequência – 241/+251 do promotor do TGF β .

3.5.3 A higromicina

A higromicina B é um aminociclitol que inibe a síntese de proteínas induz a morte de células eucariotas. O pcDNA3.1/Hygro (InvitrogenTM) é um plasmídeo utilizado para as expressões estáveis e transitórias nas células de mamíferos. Ele permite a expressão da higromicina-B-fosfotransferase que destrói a higromicina B por fosforilação, o que permite a sobrevivência e seleção de células transfectadas.

3.5.4 O inibidor do TGF β

O produto SB431542 hidrato é um inibidor da atividade do receptor tipo quinases (ALKs, activin receptor-like kinase) do TGF β . É um inibidor de quinases ALK 4/5/7 (receptor tipo I do TGF β (INMAN *et al.* 2002). Foi adquirido da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA.

3.6 PARÂMETROS ANALISADOS

IC₅₀= concentração do produto para a qual 50% da resposta máxima é inibida.

EC₅₀= concentração para a qual 50% do efeito máximo de um agonista é obtido.

% de inibição= $[(\text{Max} - X)/\Delta] \times 100$.

O Max corresponde à resposta máxima obtida (em dados brutos), X o valor obtido para a concentração Y do produto (em dados brutos) e Δ a diferença entre o valor máximo e o valor basal (em dados brutos).

4. RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TRANSFEÇÃO

Uma seleção de programas (A23, A27, A33, U25, T20), cada um com características de voltagem, amperagem e durações específicas foi testada com um vetor contendo um gene reporter que codifica para uma proteína fluorescente, a GFP (Green Fluorescent Protein), plasmídeo pmaxGFPTM (Nucleofector Technology). Isto permite analisar a eficácia das transfeções, de acordo com o programa estudado, observando-se a fluorescência das células ao microscópio. O número de células fluorescentes é representativo da eficácia da transfecção. A qualidade de transfecção varia de acordo com o protocolo ao outro. Certos protocolos possuem um mesmo efeito sobre a mortalidade das células. A observação das células fluorescentes ao microscópio permitiu identificar os protocolos A33 e U25 como os mais eficazes. (Figura 3)

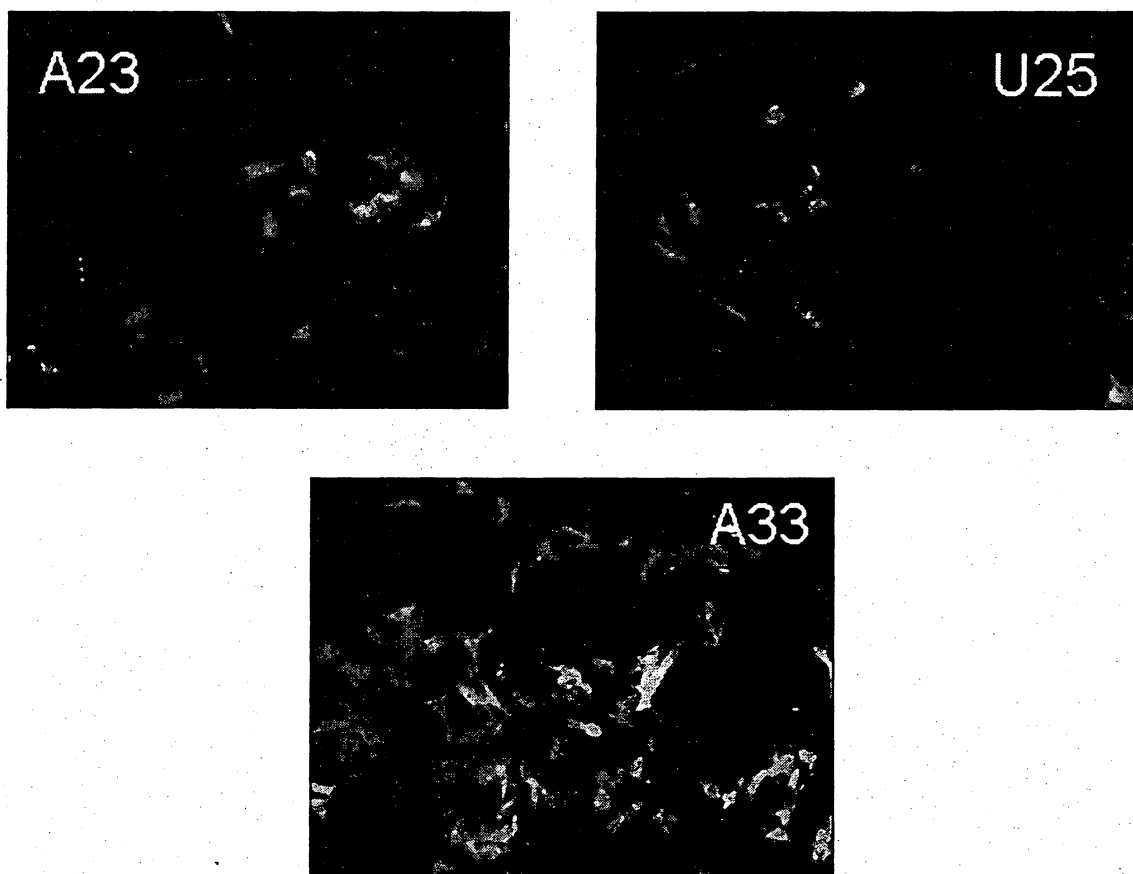


Figura 3 : Fotografia de células Mes13 de camundongo transfectadas com 1 µg (micrograma) do vetor capaz de codificar GFP, tiradas em microscopia de fase óptica de fluorescência.

4.2 PADRONIZAÇÃO DA TRANSFEÇÃO COM O GENE REPORTER CRE_LUC

A adenilato ciclase hidrolisa o ATP em AMPc, e permite detectar o aumento de AMPc após ativação pela forskolina. O AMPc ativa então a proteína quinase A (quinase dependente de AMPc) que fosforila o fator de transcrição CREB, que se liga com os elementos de resposta CRE do vetor Cre_Luc, que irão promover a expressão do gene que codifica para uma enzima luciferase. Adicionando-se seu substrato, a luciferina, a reação libera fótons que são medidos em um luminômetro. Este vetor permite caracterizar a resposta funcional das células à forskolina.

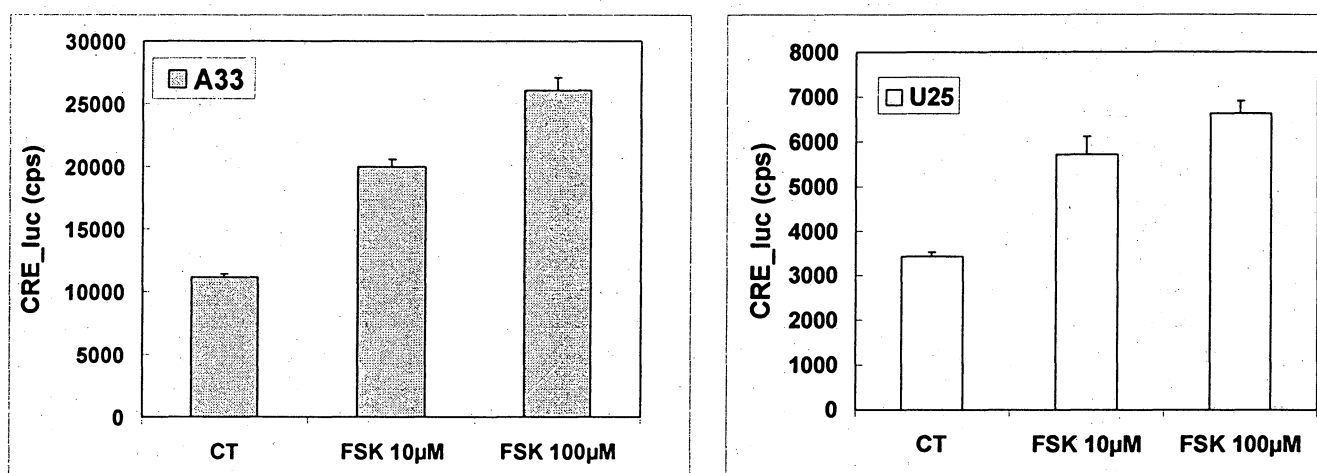


Figura 4 : Resposta funcional da forskolina (FSK) sobre as células mesangiais de camundongo com dois protocolos de transfecção. Dados expressos em cps (cópias por segundo). CT= Controle

A forskolina estimulou o CRE-luc com um efeito dependente da concentração. Os níveis de base foram diferentes entre os dois protocolos de transfecção (aproximadamente 10.000 cps com A33 e 3.000 com U25) (Figura 4). Como a resposta à forskolina foi a mesma em proporção (% de controle) (Figura 5), o protocolo A33 foi escolhido para a sequência das experiências em razão de uma transfecção mais eficaz.

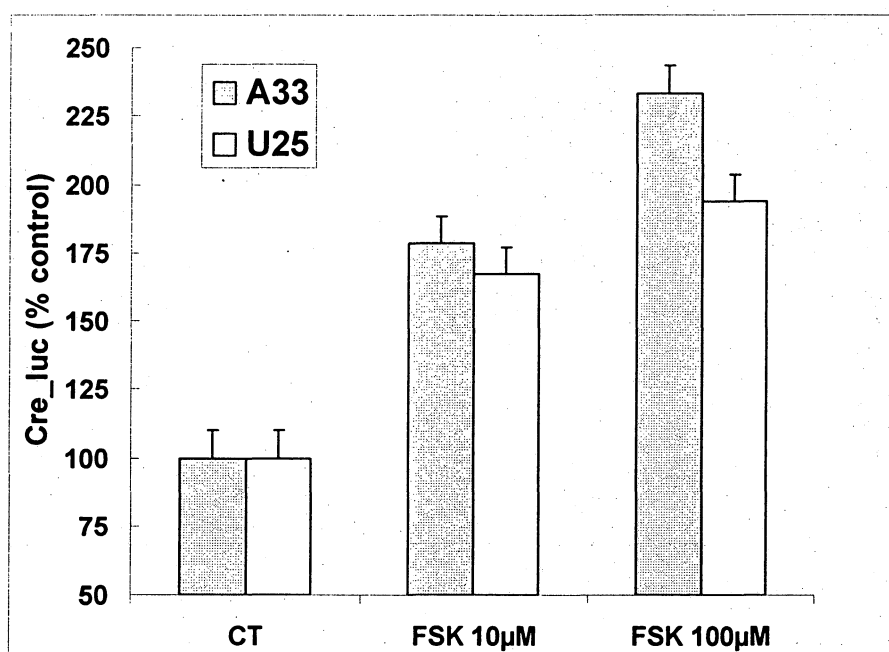


Figura 5 : Resposta proporcional da forskolina de células Mes13 transfectadas com o gene Cre-luc de acordo com dois protocolos. CT=controle; FSK= forskolina.

4.3 LINHAGENS ESTÁVEIS SMAD

4.3.1 Resultados das experiências em transfecção transitória

A transfecção transitória é aquela em que não há ainda uma estabilidade do plasmídeo na célula. Os testes são realizados 48 horas após a transfecção. As linhagens ditas policlonais são aquelas onde as células são mantidas em cultura por um tempo maior após transfecção, e selecionadas pela higromicina, o gene de resistência, ou seja, somente as células com o plasmídeo estável são selecionadas.

As proteínas SMAD são uma família de fatores de transcrição encontradas em vertebrados, insetos e nemátodos (HELDIN *et al.*, 1997). SMADs 1, 2, 3, 5 e 8 (« receptor-regulated SMADs ou RSMADs ») são o substrato dos receptores do TGF- β . Os primeiros testes de transfecção transitória foram realizados com SMAD e SMAD $\frac{3}{4}$. Na realidade, a sequência 5'-GTCTAGAC-3' é específica de ligação de proteínas SMAD (ZAWEL *et al.* 1998). O fato de esta sequência ser repetida 3 vezes no vetor permite uma melhor ativação da transcrição. Os resultados são mostrados em dados brutos (Figuras 6 e 7):

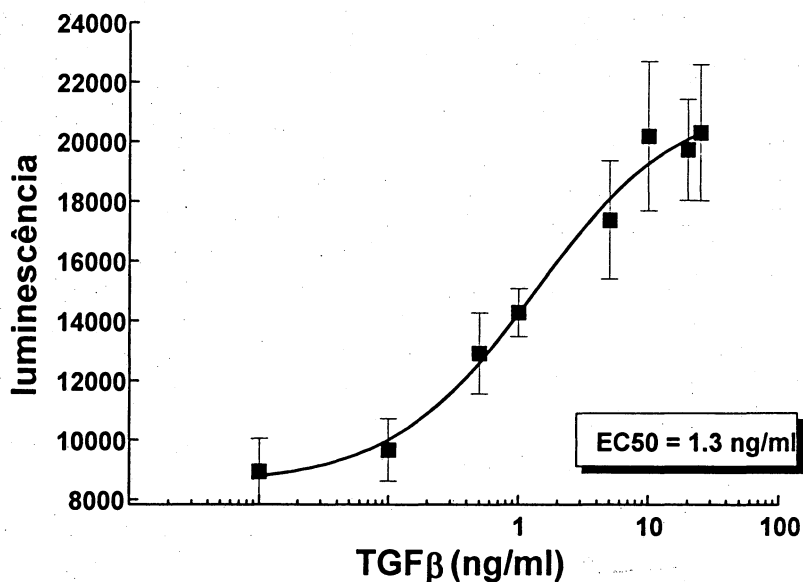


Figura 6 : Células Mes13 transfectadas com um reporter pSmad-luc, tratadas com TGF-β. Ng/ml= nanograma/mililitro. (n=3).

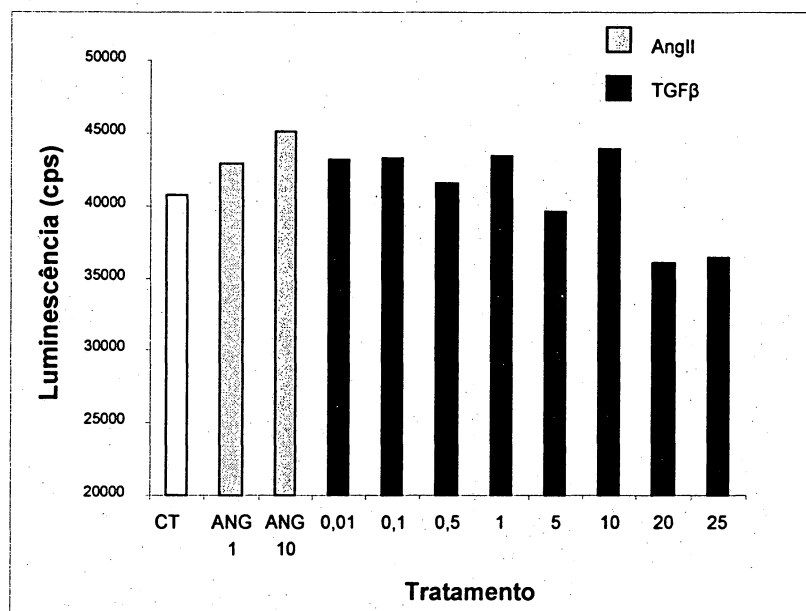


Figura 7: Células MEs13 transfectadas com um reporter pSMAD-luc 3/4, tratadas com TGF-β (ng/ml) e Angiotensina II (μM). Ang II=Angiotensina. n=2

O TGF-β provocou um aumento dependente da concentração de luciferase nas células transfectadas com o vetor SMAD (Figura 6). Uma linhagem estável foi então lançada com o vetor SMAD co-transfectado com o vetor higromicina nas células mesangiais de camundongo. Por outro lado, nenhuma ativação significativa (Figura 7) foi observada em células transfectadas com o vetor SMAD 3/4. Ambos, Smad e Smad 3/4 foram tratados à

Angiotensina II, porém, não foi observada resposta dose-dependente.

As células transfectadas foram então guardadas em meio de seleção durante 8 dias e testadas paralelamente às diluições limites, para verificar a estabilidade do plasmídeo dentro do núcleo das células. As células foram sub-cultivadas e colocadas em placas 96 poços, à 10.000 células por poço, e testadas em gama TGF- β . Isto permitiu verificar se as células foram seleccionadas pela higromicina, e se somente as transfectadas proliferam. Os dados são expressos em porcentagem de controle. (Figura 8) :

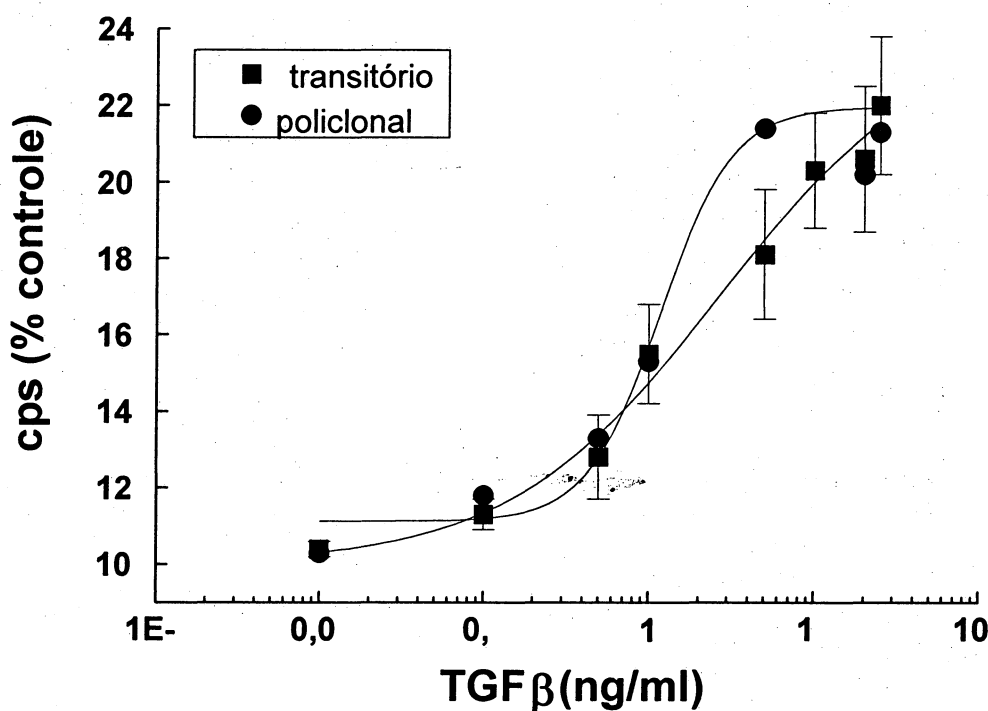


Figura 8 : Efeito do TGF- β sobre a ativação do reporter SMAD em células Mes13 testadas em transfecção transitória ou na linhagem « policlonal ».

Não houve diferença significativa na resposta do TGF β nas duas condições. O resultado positivo obtido sobre o « pool » de células « policlonais » permitiu uma seleção de clones positivos após as diluições limitantes desta mesma população de células.

Para validar farmacologicamente os resultados obtidos em transfecção transitória, as experiências foram realizada com um inibidor seletivo de ALKs 4, 5 e 7, os receptores do TGF β . Esta molécula inibe a fosforilação por ALK4 e 5 *in vitro* de SMAD 3 imobilizado e purificado com uma IC50 de 94 nM (CALLAHAN *et al.*, 2002).

As células foram transfectadas, colocadas em placa 96 poços e tratadas ao TGF β à uma

concentração de 20 ng/ml em presença de uma gama do inibidor : 0,01; 0,1; 10 e 100 μM . O resultado é expresso em % de inibição da resposta do TGF β (Figura 9)

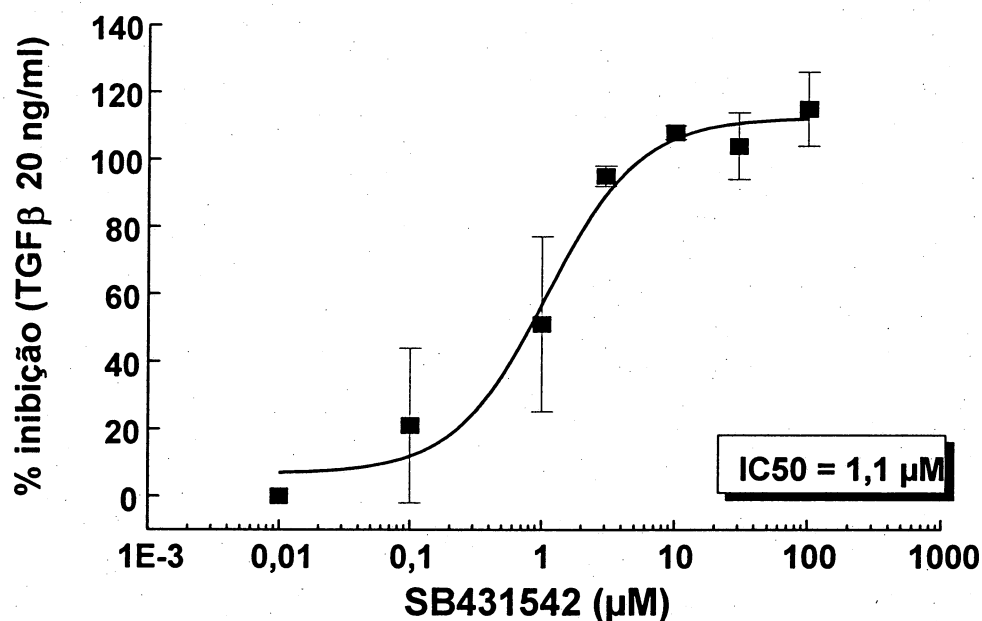


Figura 9: Inibição pelo SB431542 da ativação de SMAD induzida pelo TGF β (20ng/ml) após transfecção transitória em células Mes13 (n=3)

Estes resultados sobre as células mesangiais de camundongo confirmaram a ativação da transdução do sinal do TGF β pela fosforilação de proteínas SMAD. A inibição desta ativação pelo SB431542 com uma IC₅₀ de 1,1 μM permitiram confirmar que se trata de um receptor de tipo ALK 4, 5 ou 7 que está implicado nas respostas das células mesangiais de camundongo ao tratamento com TGF β .

4.3.2 Resultados com as linhagens estáveis

Os clones obtidos após transfecção estável foram sempre submetidos ao primeiro teste com TGF β . São sub-cultivados com 100 μl de tripsina, neutralizada com 200 μl de meio completo. Do volume total, 150 μl foram depositados em quadruplicata em placas 96 poços:

75 μ l por poço, e testados com 20ng/ml de TGF β , e 150 μ l amplificados em placas 24 poços. Os níveis de transfecção dos clones selecionados variam entre 300 e 30.000 cópias por segundo (cps). Após amplificação, os clones transfectados são contados e testados em gama TGF β : 0,01; 0,1; 0,5; 1; 5; 10 e 20ng/ml Os 4 clones mostrados na Tabela 1 foram selecionados como exemplo de diferentes níveis de base. Os dados são expressos em luminescência (cps):

Tabela 1: Diferentes níveis de base de clones SMAD testados ao TGF β 20ng/ml. Os resultados são mostrados em dados brutos (cps).

	Clone nº1	Clone nº2	Clone nº3	Clone nº4
Controle	279	9536	10852	269
TGF β (20 ng/ml)	364	31416	31416	705

Estes 4 clones foram testados novamente, com concentrações crescentes de TGF β entre 0,01 e 20 ng/ml. Os resultados obtidos com os clones 1, 2, 3 e 4 para os quais o TGF β estimula a expressão do vetor são mostrados abaixo (Figuras 10, 11, 12e 13). Esta expressão aumentou paralelamente às concentrações de TGF β (efeito dependente da concentração). Esta estimulação é expressa em dados brutos de luminescência (cps):

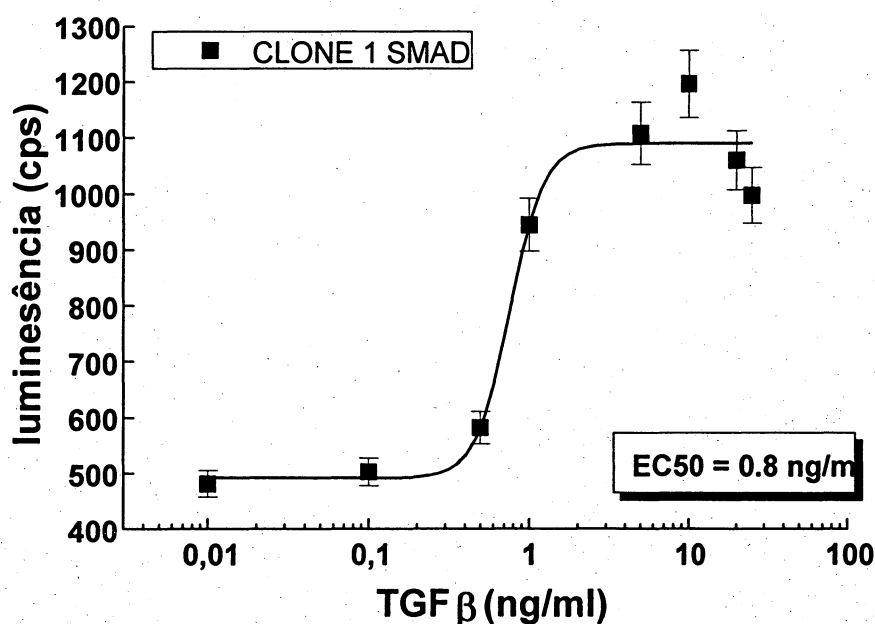


Figura 10: Resposta do clone nº1 ao tratamento com TGF β . Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (cps) (n=1).

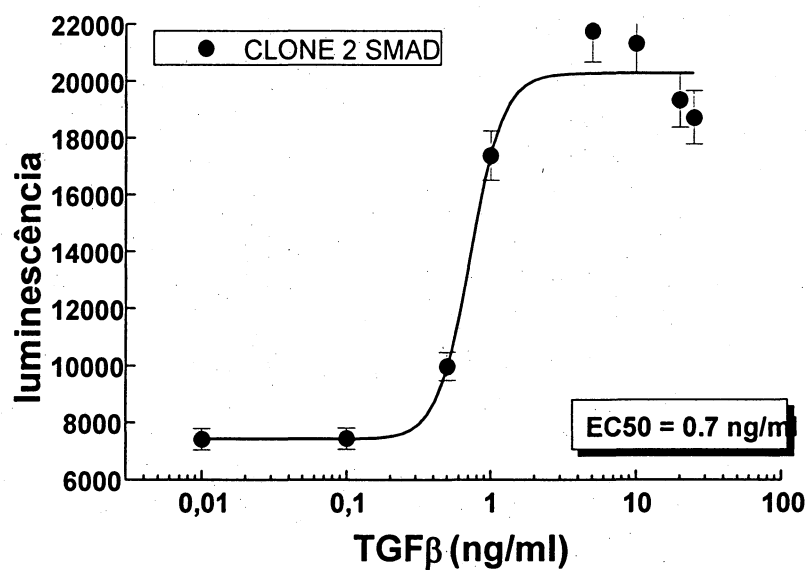


Figura 11: Resposta do clone nº2 ao tratamento com TGFβ. Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (cps) (n=1).

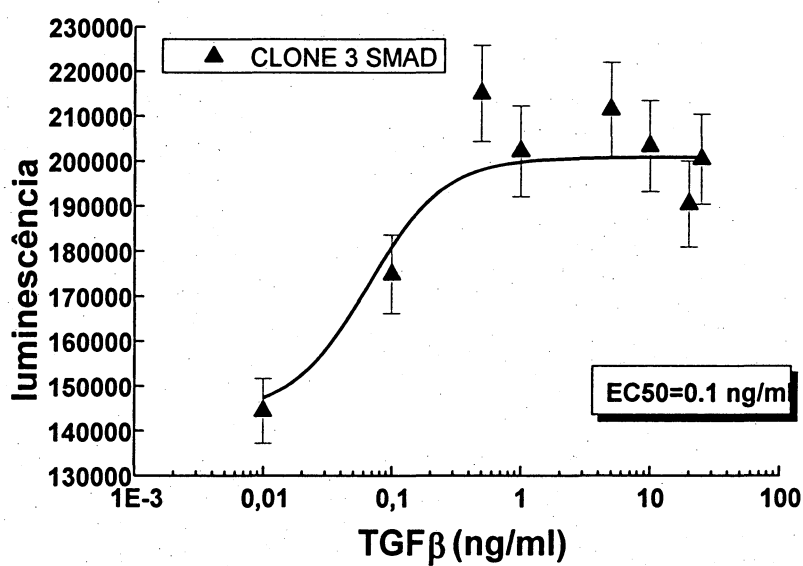


Figura 12: Resposta do clone nº3 ao tratamento com TGFβ. Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (cps) (n=1).

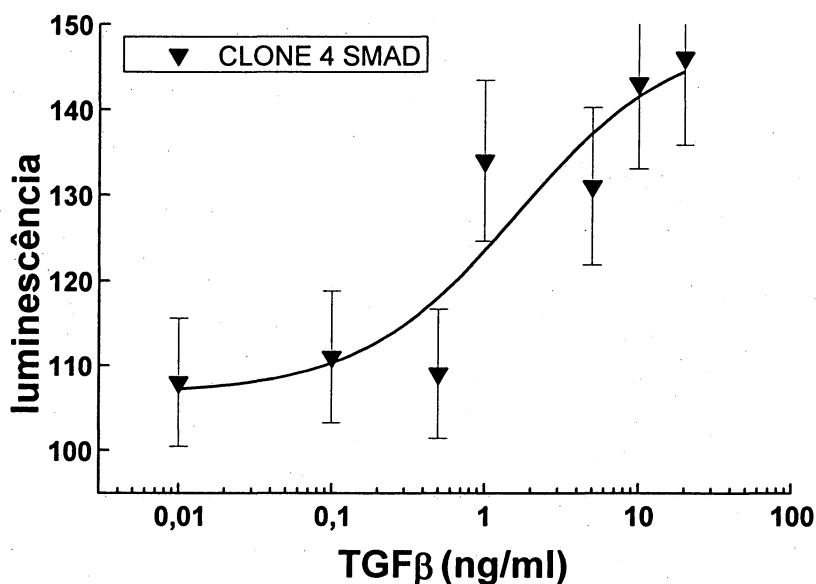


Figura 13: Resposta do clone nº4 ao tratamento com TGFβ. Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (cps) (n=1).

Os clones 1 e 4 possuem níveis de base fracos (aproximadamente 500 e 100 cps respectivamente), e mesmo se respondem ao TGFβ, não foram escolhidos por esta mesma razão, pois tanto o nível de base da expressão do vetor como sua resposta à estimulação são importantes. O clone 2 foi testado novamente após amplificação. Os resultados obtidos mostraram-se homogêneos, com nível de base do sistema reporter sendo suficiente para usar este clone em experiências futuras de screening (aproximadamente 8.000 cps). Assim, este clone está sendo amplificado.

O mesmo clone foi submetido ao tratamento com o inibidor de TGFβ, o SB431542 (Figura 14):

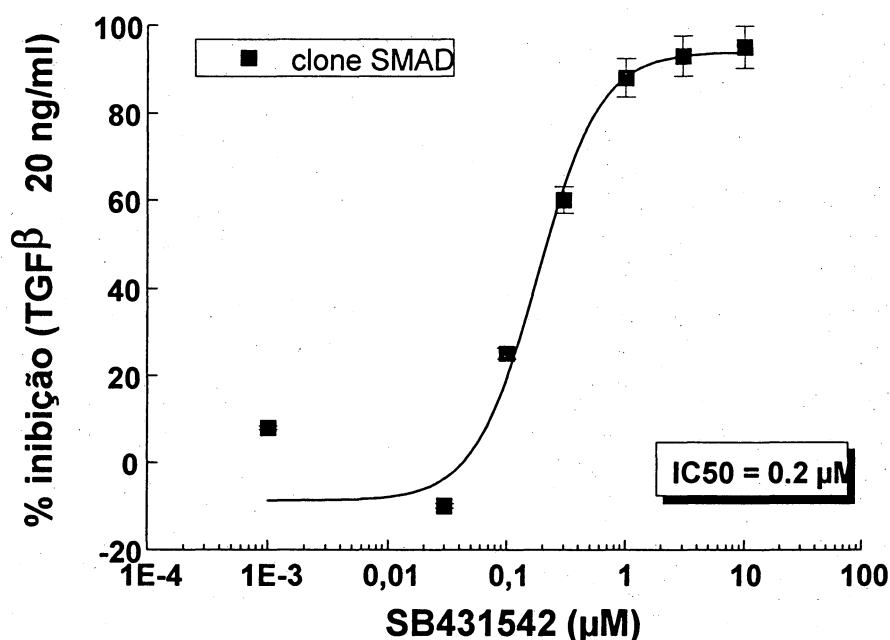


Figura 14: Efeito do SB431542 sobre a ativação do reporter SMAD induzido por 20ng/ml de TGFβ no clone 2 de Mes13 (n=1)

4.4 LINHAGEM ESTÁVEL PHTG 4/10

O phTG é o promotor do TGFβ humano. É uma região à montante do gene do TGFβ que permite sua autoregulação, com a ajuda de seqüências ativadoras e inibidoras de sua transcrição. 2 regiões reguladoras (chamadas « promotoras ») já foram identificadas, o primeiro promotor possui as seqüências -1362 à +11. As seqüências que permitem esta autoregulação foram localizadas entre os nucleotídeos -453 et +11 (KIM *et al.*,1989). O promotor constituído das seqüências -1362 e -453, possui regiões que inibem a atividade de transcrição do TGFβ. O segundo promotor (seqüências +1 à +271) possui várias regiões responsáveis por sua autoregulação, as regiões entre +150 et +173, dois sítios AP-1 e um sítio Sp1 (GC-Boxes). O promotor do TGFβ tem assim dois sítios AP1 (-418/-412 et -371/-364), que são também elementos de resposta à Angiotensina II (WEIGERT, 2001).

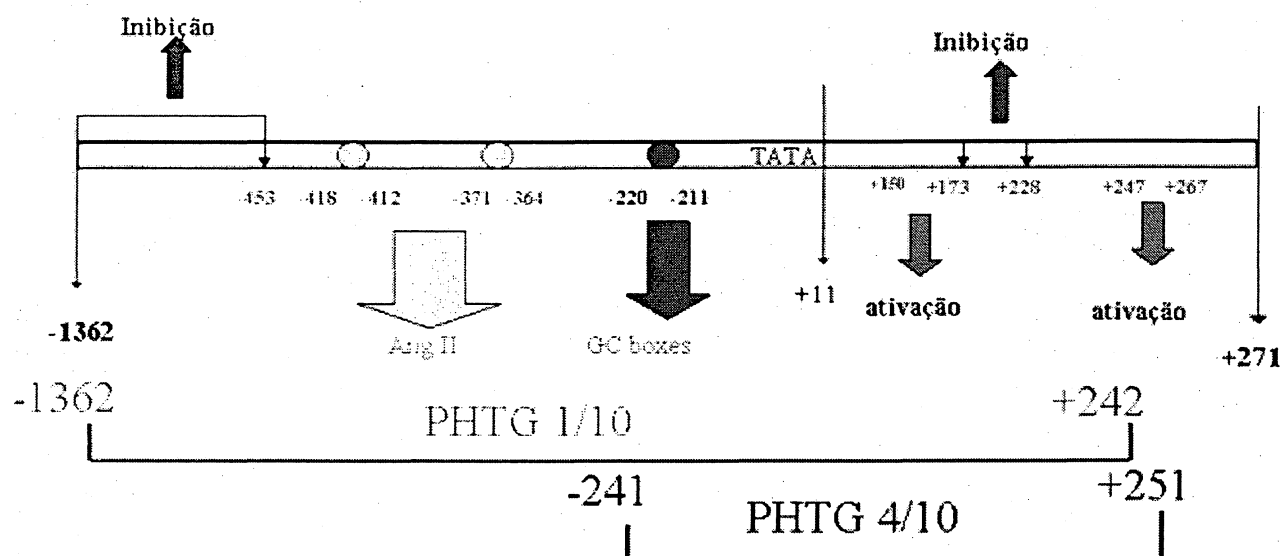


Figura 15 : Esquema d promotor do TGFβ humano.

Ensaio de transfecção para criar as linhagens estáveis foram realizados com o vetor phTG 1/10 e 4/10. O primeiro expressa a sequência completa do promotor TGFβ, -1362 /+242, o segundo a sequência -241/+251 do mesmo promotor.

4.4.1 Resultados das experiências em transfecção transitória

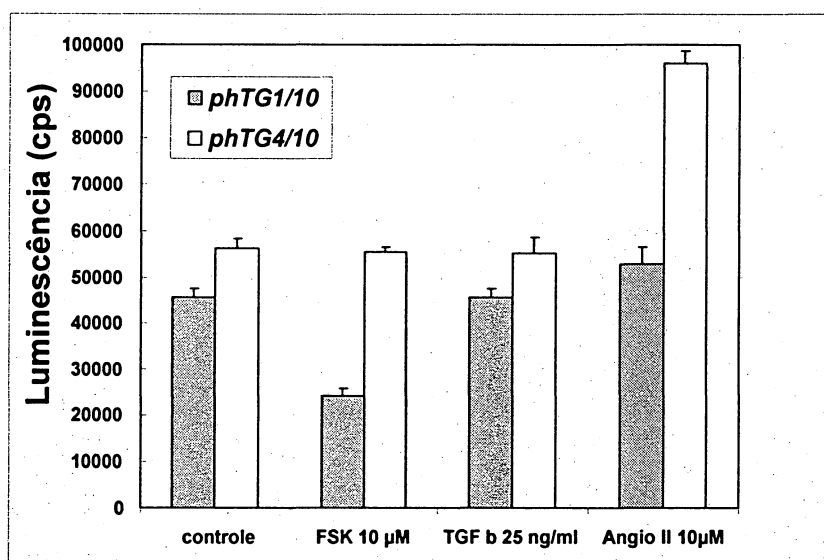


Figura 16 : Células Mes13 transfectadas com um vetor phTG1/10 e phTG4/10, tratadas ao TGFβ, à Angiotensina II e à forskolina.

A angiotensina II estimulou o promotor pH₂G 4/10 em sua dose mais forte de 100 μ M, mas nenhum efeito foi observado com o vetor pH₂G 1/10 (Figura 16).

O efeito inibidor da forskolina sobre a expressão de base do vetor confirmou a presença de sequências inibidoras entre as regiões 453 et -1362 no vetor pH₂G 1/10. Tratamentos à forskolina e ao isoproterenol aumentam a concentração de AMPc e a fosforilação de CREB (response element binding protein) e inibição da produção de colágeno, induzida pelo TGF β ; as mesmas substâncias bloqueiam a ativação da « extracellular signal-regulated kinase $\frac{1}{2}$ » (ERK $\frac{1}{2}$) induzida pelo TGF- β . Os agentes que aumentam o AMPc diminuem então a ativação do terminal C-Jun-NH₂ kinase e reduzem a ligação do coativador transcricional « CREB-binding protein 1 » ao complexo transcricional SMAD 2, 3 e 4 (LIU *et al.*, 2006).

Tendo em vista a resposta a 100 μ M de Angiotensina II obtida sobre o vetor pH₂G 4/10, novas transfecções foram realizadas com este vetor e as células submetidas a uma gama completa de Angiotensina II. Os resultados assim obtidos são apresentados no gráfico abaixo (Figura 17)

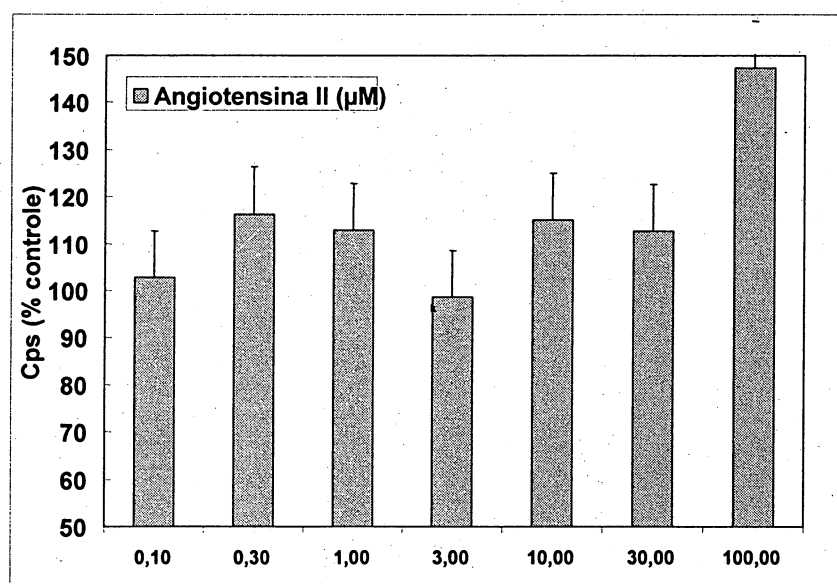


Figura 17: Células Mes13 em transfecção transitória com o vetor pH₂G 4/10, tratadas com Angiotensina II.

Nenhum efeito dependente da concentração foi observado, somente um estímulo à concentração mais elevada de Angiotensina II (100 μ M). Como esta concentração elevada não é usual, e não obtivemos uma resposta dose-dependente à Angiotensina II, este tratamento não foi continuado. Seriam necessários mais experimentos com Angiotensina II para novas conclusões. Como há uma sequência que permite a autoregulação do TGF β em seu promotor pH₂G (KIM *et al.*, 1989), tratamentos ao TGF- β foram efetuados em transfecção transitória.

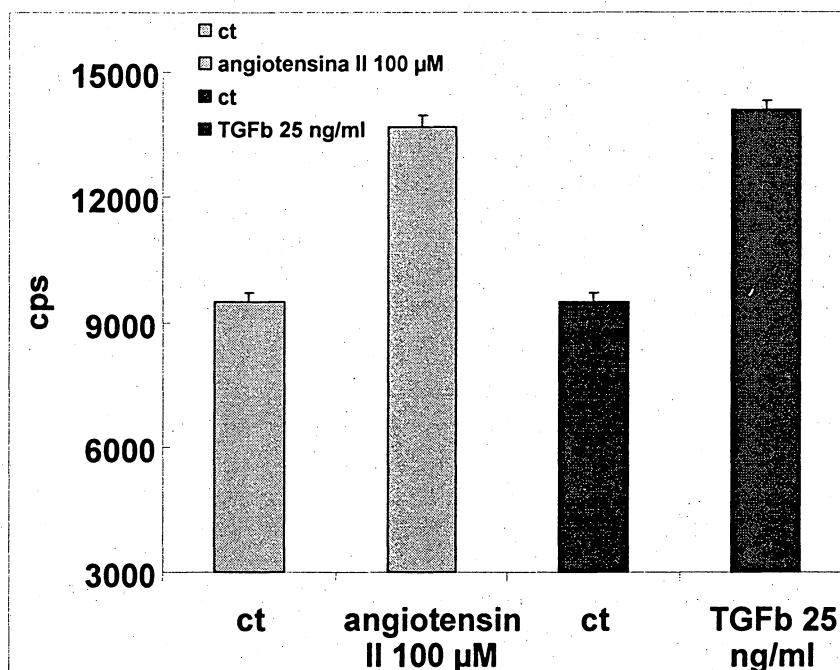


Figura 18: Células transfectadas com o vetor phTG 4/10 e tratadas ao TGFβ e à Angiotensina II. Os resultados são expressos em dados brutos.

O promotor foi estimulado pelo TGFβ a uma concentração de 25ng/ml. Tanto nas figuras 16, 17 e 18 observamos uma estimulação pela Angiotensina II a 100 μM. A concentração de 100 μM de Angiotensina II não é usual, e não obtivemos uma resposta dose-dependente a este tratamento. O vetor phTG 4/10 foi então escolhido para estabelecer as linhagens estáveis, por apresentar uma resposta ao TGFβ.

4.4.2 Resultados com as linhagens estáveis:

Aproximadamente 20 dias após serem submetidos às diluições limites, os clones foram submetidos ao primeiro teste com o TGFβ. Eles foram subcultivados com 100 μl de tripsina, neutralizados com 200μl de meio de cultura completo. Do volume total, 150μl são depositados em quadruplicatas em placas 96 poços, e testados a uma concentração 10μM de Angiotensina II, e 150μl amplificados em placas 24 poços. Os níveis de transfecção dos clones selecionados, ao momento do primeiro teste, variavam entre 1.200 e 1.790.000 cps. Após amplificação dos clones, as células foram contadas e testadas em gama Angiotensina II. 17 clones foram selecionados. Os resultados obtidos com 3 deles são mostrados na Tabela 2 como exemplo de diferentes níveis de base. Os dados são expressos em cps:

Tabela 2: Diferentes níveis de base dos clones testados com Angiotensina II (10 μ M). Os resultados são mostrados em dados brutos (cps).

	Clone nº4	Clone nº6	Clone nº11
Controle	1435	164075	972083
Ang II (10 μ M)	3152	190743	1076550

Todos os 17 clones foram testados novamente, desta vez em gama Angiotensina II às concentrações 0,1; 1 e 10 μ M. Não houve efeito dependente da concentração neste tratamento, como indicado na Tabela 3:

Tabela 3: Tratamento em gama Angiotensina II. Os resultados são expressos em dados brutos (cps).

	Clone nº4	Clone nº6	Clone nº8	Clone nº11
Controle	1954,5	52613	19816	495916,5
Ang II (0,1 μ M)	2375,5	48546	22184,5	544796,5
Ang II (1 μ M)	2353,5	50515,5	20094,5	439563,5
Ang II (10 μ M)	2375,5	51692,5	17888	503204,5

Todos os clones foram testados novamente em gama Angiotensina II e TGF β a uma concentração de 20ng/ml. Os clones responderam ao TGF β , porém não responderam à Angiotensina II.

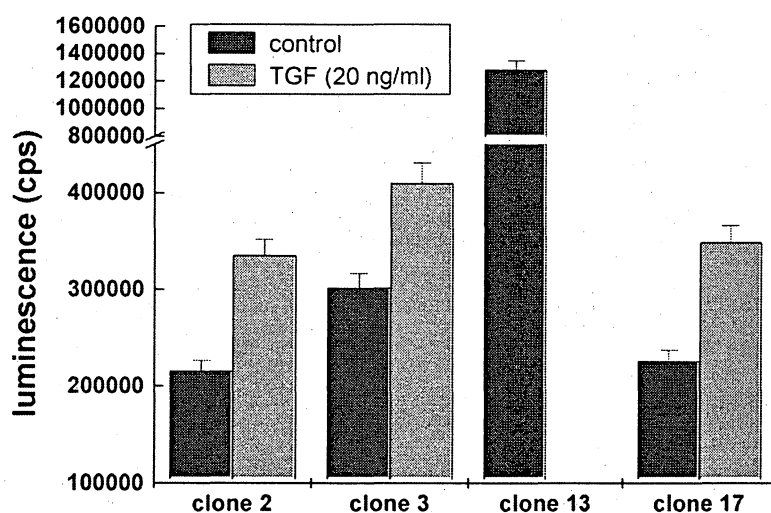


Figura 19: Estimulação de células transfectadas com um vetor pH4/10 pelo TGF β (20 ng/ml). Os resultados são expressos em dados brutos.

A estimulação do promotor foi induzida pelo TGF β , o nível de base passa de 215.000 a 335.000, por exemplo, para o clone 2 (aumento de 1,56x). Então, os 4 clones, numerados 2, 3, 13 e 17, estimulados pelo TGF β foram selecionados e em seguida testados em gama TGF β , de 0,01 a 20 ng/ml. Os resultados para cada clone são mostrados abaixo, nas Figuras 20, 21, 22 e 23

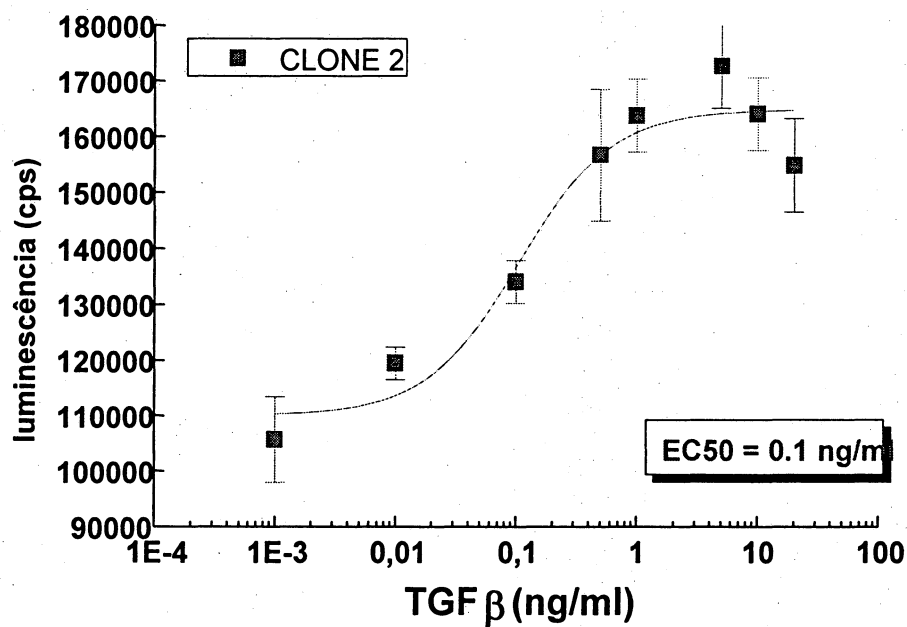


Figura 20: Reposta do clone nº 2 ao tratamento TGFβ. Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (n=3).

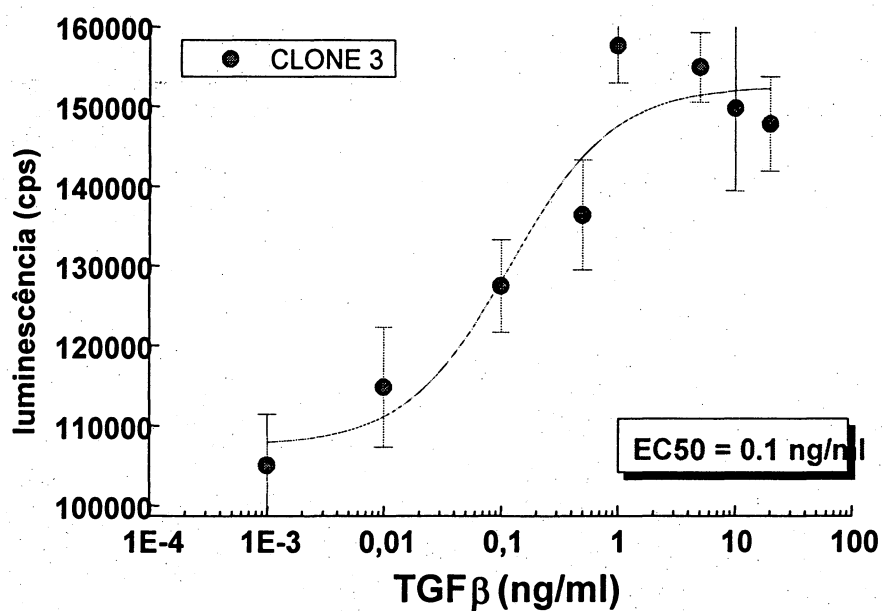


Figura 21: Reposta do clone nº 3 ao tratamento TGFβ. Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (n=3)

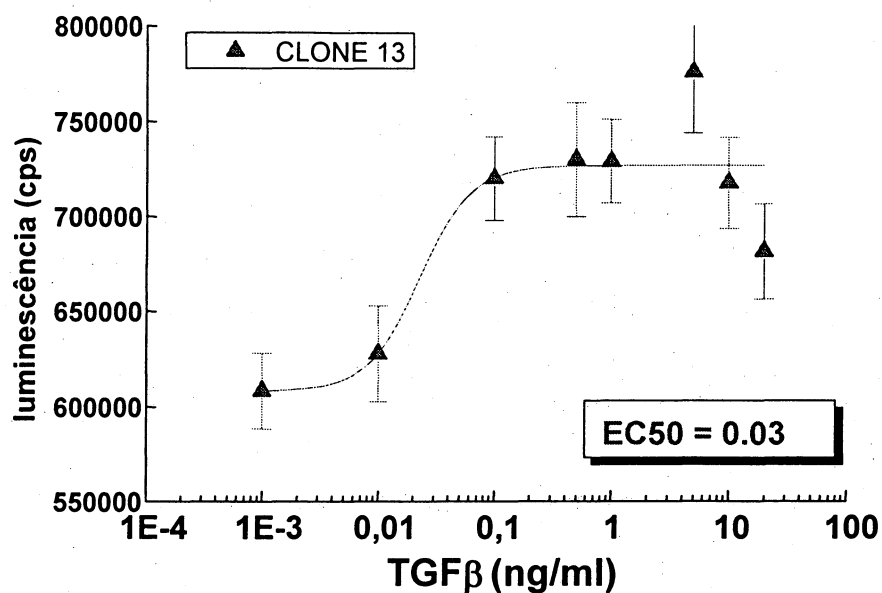


Figura 22: Reposta do clone nº 13 ao tratamento TGFβ. Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (n=3).

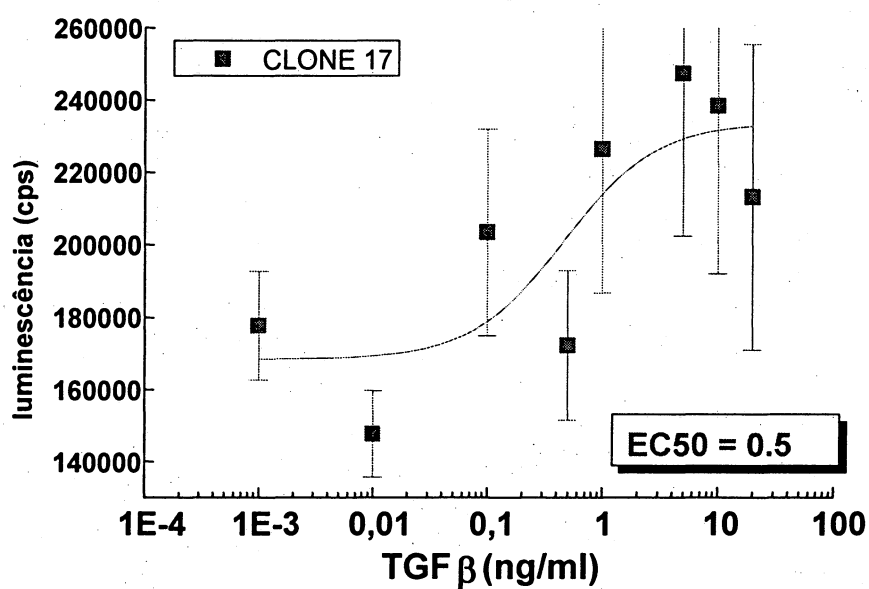


Figura 23: Reposta do clone nº 17 ao tratamento TGFβ. Os resultados são expressos em dados brutos de luminescência (n=3).

Os clones 2 e 3 possuem a resposta mais homogênea. Possuem a mesma EC50 da ordem de 0,1 ng/ml. Ainda, os aumentos da resposta ao TGFβ são mais significativos nestes clones que nos clones 13 e 17. Estes clones 2 e 3 foram escolhidos para amplificação para caracterização complementar.

4.5 INIBIÇÃO DOS CLONES SMAD E PHTG 4/10 PELO SB431542

O clone SMAD número 2 e o clone phTG 4/10 número 2, tendo as respostas mais significativas ao TGF β , foram escolhidos para as experiências com o SB431542, inibidor do receptor de tipo I do TGF β (Figura 24):

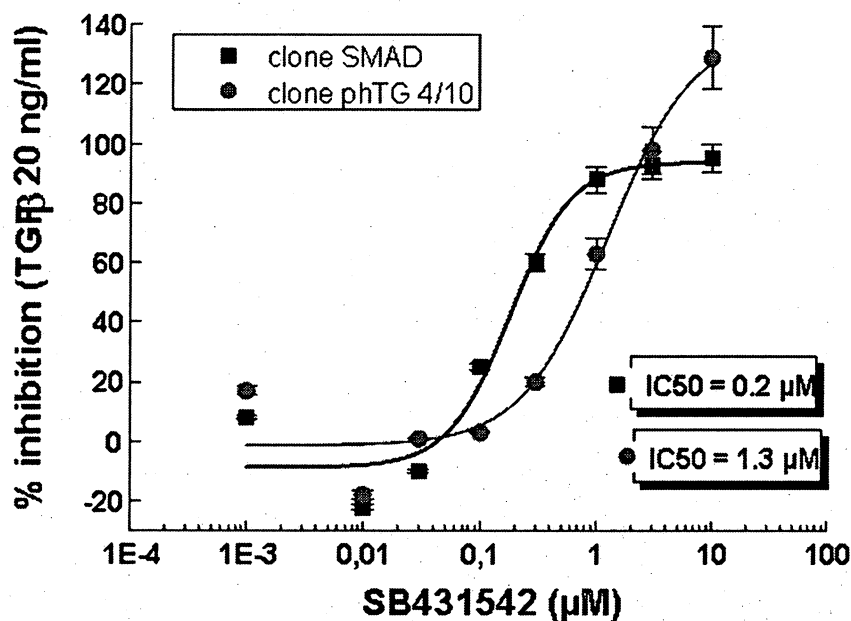


Figura 24: Inibição pelo SB431542 da resposta ao TGF β sobre os clones SMAD e phTG 4/10 (n=2)

O SB431542 inibiu a resposta induzida por 20ng/ml de TGF β de maneira dependente da concentração. Não pareceu haver uma diferença de sensibilidade entre os dois vetores na resposta a esta molécula. Para o clone SMAD, uma IC₅₀ de 0,2 μM foi observada, enquanto o clone phTG 4/10, uma IC₅₀ de 1,3 μM. Ainda que um número maior de experimentos seja necessário para verificar se esta diferença foi realmente significativa, a diferença entre a inibição da resposta ao TGF β entre os dois tipos de construção pode-se explicar unicamente por uma diferença de sinalização intracelular, pois os receptores implicados são necessariamente os mesmos em ambos os casos (mesmas células Mes13).

4.6 ATIVAÇÃO DE SMAD PELO TGFB EM CÉLULAS MESANGIAIS HUMANAS.

A construção de duas linhagens estáveis permitiu mensurar a ativação transcricional das células pelo TGF β com sistemas reporters phTG e SMAD. Estes experimentos são realizados em uma linhagem de células mesangiais de camundongo transformadas por SV40 e que possui um fenótipo modificado em comparação às células humanas em cultura primária. Estas linhagens foram desenvolvidas com um objetivo de screening e a etapa seguinte foi a de validar os resultados obtidos sobre estas linhagens nas células mesangiais humanas, e com um fenótipo mais semelhante ao fenótipo natural.

Nas células humanas, SMAD 3 e 2 foram fosforilados após estimulação pelo TGF β . Western-Blots com um anticorpo anti SMAD 3 fosforilado nas serinas 423 e 425, foram então realizados sobre amostras de lisados de células mesangiais humanas, tratadas ao TGF β (20 ng/ml). Cinéticas foram antes feitas para se encontrar o pico de ativação de SMAD 3 (Figura 25). Em paralelo, uma marcação foi realizada com uma proteína de citoesqueleto (alfa-actina de músculo liso) para verificar a homogeneidade do depósito e da transferência.

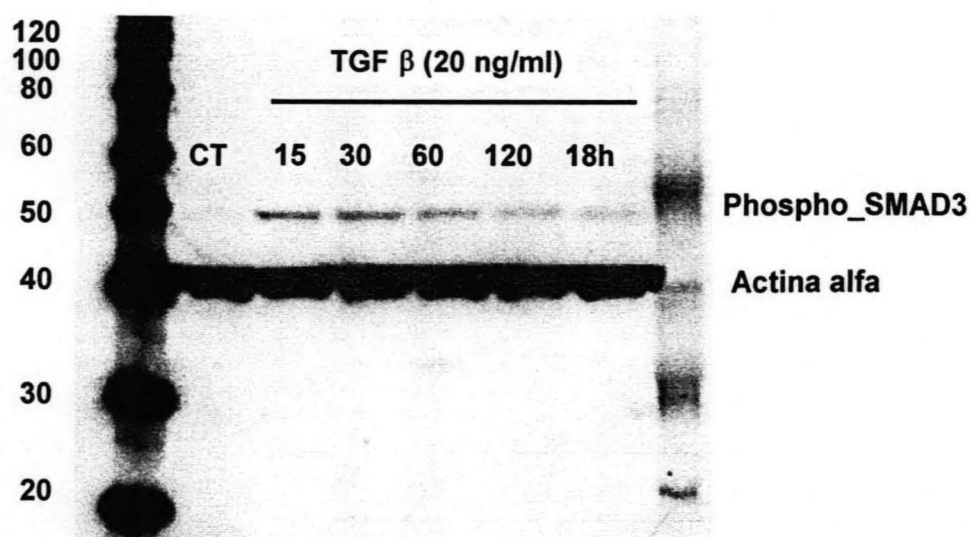


Figura 25: Western-Blot PhosphoSMAD3. Amostras de células mesangiais humanas tratadas com 20ng/ml de TGF- β . As células foram lisadas 15 e 30 minutos, 1 hora, 2 e 18 horas após o tratamento. Western representativo de 2 experimentos realizados nas mesmas condições.

O TGF β estimulou a fosforilação de SMAD 3 de maneira transitória. O máximo de ativação foi observado por um tempo curto de 15 minutos. A marcação com alfa-actina de músculo liso confirmou a homogeneidade dos depósitos.

Para confirmar o paralelo com os resultados obtidos com as células mesangiais de camundongo, experiências foram realizadas com o SB431542, inibidor de ALK5. As células foram tratadas por 15 minutos com 20 ng/ml de TGF β com várias concentrações do inibidor (Figura 26).

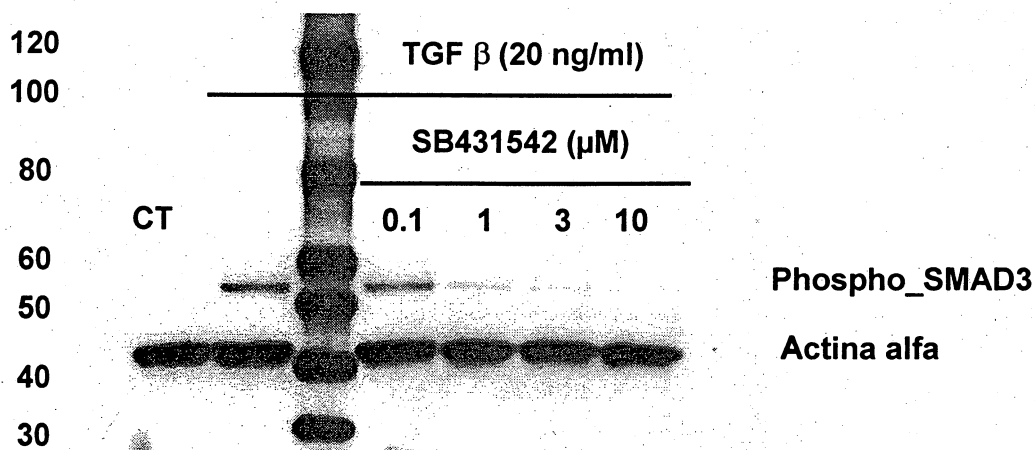


Figura 26: Western-Blot PhosphoSMAD3. amostras obtidas de células mesangiais humanas. Tratamento TGF β 20ng/ml + as concentrações (0,1; 1; 3 e 10 μ M) do inibidor SB431542. Western representativo de 2 experimentos realizado nas mesmas condições.

O SB431542 inibiu de maneira dependente da concentração a fosforilação de SMAD3 induzida pelo TGF β (20ng/ml). Este resultado confirmou que o modo de ativação (receptor + sinalização) do TGF β foi similar na linhagem de células mesangiais de camundongo e em primocultura de células mesangiais humanas.

5. DISCUSSÃO

As diferentes experiências realizadas ao longo deste trabalho conduziram ao estabelecimento de linhagens estáveis de células mesangiais de camundongo (Mes13) permitindo o estudo da via de sinalização do TGF β . Esta linhagem de células mesangiais transformadas por SV40 conserva características fenotípicas de células mesangiais (expressão de alfa-actina), possuindo uma capacidade de proliferação importante ligada à transformação. Isto permitiu uma cultura em massa destas células, condição necessária a um High Throughput Screening (ampla e variada análise). Duas linhagens foram construídas: uma expressando uma parte do promotor do TGF β (seqüência -241/+251) a montante da luciferase utilizada como gene reporter e a segunda os elementos de resposta SMAD com as seqüências de nucleotídeos AGTATGTCTAGACTGA repetidas 3 vezes a montante da luciferase. Ainda que as células tenham sido exatamente transfectadas nas mesmas condições, os níveis de expressão de base foram diferentes em cada clone (4000 cps para SMAD e 15000 para pH β). Por outro lado, os dois tipos de clones respondem de maneira dependente da concentração ao TGF β e a EC₅₀ para este é da mesma ordem de grandeza (0,6 ng/ml et 1 ng/ml). A resposta ao TGF β nos dois tipos de clone foi inibida por um inibidor específico de receptores quinase ALK 4/5/7 (receptores tipo I do TGF β) (INMAN *et al.* 2002). Nas células mesangiais humanas, o TGF β ativou a via de sinalização SMAD e principalmente SMAD3, que foi fosforilado 15 minutos após estimulação com o TGF β . Esta fosforilação de SMAD3 foi igualmente inibida por SB431542, indicando que o receptor implicado nestas células foi o mesmo que nas células mesangiais de camundongo. Experimentos de medida de expressão por RTPCR e caracterização funcional com ajuda de siRNA serão realizados na seqüência para identificar o subtipo preciso de receptor, ALK4 ou ALK5 ou ALK7 implicado nos dois tipos celulares.

As ferramentas criadas vão assim permitir a pesquisa de moléculas implicadas na via de sinalização do TGF- β . A via TGF- β /SMAD é controlada em diferentes níveis (receptor, pós receptor) incluindo a regulação da expressão do TGF β e/ou de seus receptores, mas igualmente a ativação do TGF β à partir de sua forma secretada latente. Na fibrose renal, inúmeros mecanismos, superexpressão de receptores ou aumento da expressão conduzem a uma hiperativação da sinalização TGF- β /SMAD. No rim normal a sinalização SMAD é regulada por uma família de proteínas cosupressoras como SnoN, Ski e TGIF. Estes antagonistas SMAD controlam assim os efeitos transcripcionais de SMADs e evitam ao tecido

toda resposta exacerbada ao TGF- β . Por exemplo, SnoN, Ski estão progressivamente diminuídos na fibrose renal levando a um aumento da sinalização TGF β . Inúmeras abordagens foram testadas estes últimos anos para bloquear o TGF β , incluindo anticorpos anti- TGF β , injeções de receptores solúveis para bloquear seus efeitos, ou métodos para bloquear sua ativação pela decorina (forma latente). Estas intervenções se traduzem por efeitos positivos em modelos animais mas a passagem destes resultados ao homem continua difícil. A identificação de pequenas moléculas que bloqueiam a via de sinalização do TGF β que poderá ser feita com as ferramentas *in vitro* desenvolvidas neste estágio deverá então trazer soluções alternativas. Uma vez sua especificidade sobre esta via de ativação evidenciada, a partir de testes com ativação de um vetor CRE_luc por exemplo, experiências complementares de caracterização em RTPCR de genes induzidos (exemplo Colágeno tipo IV ou fibronectina) pelo TGF β nestas células deverão ser utilizadas para validar funcionalmente estas moléculas. Então, estes produtos serão testados em modelos animais apresentando patologias associadas à fibrose renal como a diabetes por exemplo. Estas diferentes etapas fazem parte do processo clássico da descoberta de um medicamento na indústria farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ATTISANO, J.; WRANA, J. L. Mads and Smads in TGF β signalling. **Current opinion in cell biology**. v.10, p. 188-194, 1998.

BREWSTER, U. C.; PERAZELLA, M. A. The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and the Kidney: Effects on Kidney disease. **American Journal of Medical Sciences**. v.116, p. 263-272, 2004.

CALLAHAN, J. F.; BURGESS, J. L.; FORNWALD, J. A.; HEER, J.; MATHUR, A. Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) type 1 receptor (ALK5). **Journal of Medicinal Chemistry**. v.45, p. 999-1001, 2002.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; DIJKE, P. TGF β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, p. 465-471, 1997.

HOODLESS, P. A.; HAERRY, T.; WRANA, J. L.; MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. **Cell**, v.85, p. 489-500, 1996.

HUSE, M.; MUIR, T. W.; XU, L.; MASSAGUÉ, J. The TGF- β receptor activation process : An inhibitor-to-substrate-binding switch. **Molecular Cell**, v.8: 671-682, 2001.

INMAN, G. J.; NICOLAS, F. J.; CALLAHAN, J. F.; REITH, A. D.; LAPIN, N. J.; HILL, C.S. SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor- β superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5 and ALK7. **Molecular Pharmacology**, v.62, p.65-74, 2002.

KIM, S. J.; JEANG, K. T.; GLICK, A. B.; ROBERTS, A. B. Promoter sequences of the human Transforming Growth Factor- β 1 Gene responsive to transforming Growth factor β 1 autoinduction, **The journal of Biological Chemistry**, v.264, No 12, p. 7041-7045, 1989.

KIM, S. J.; DENHEZ, F.; KIM, K. Y.; ROBERTS, A. B. Activation of the second promoter of the transformin growth factor- β 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, No 32, p. 19373-19378, 1989.

LIU, Y. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutic. **Kidney International**, v. 69, p. 213-217, 2006.

MASSAGUÉ, J.; SEOANE, J.; WOTTON, D. Smad transcription factors. **Genes & Development** v. 19, p. 2783-2810, 2005.

MASSAGUÉ, J.; WOTTON, D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. **The EMBO Journal**, v.19 No.8, p. 1745-1754, 2000.

NIEUWENHOVEN, F. A.; JENSEN, L. J. N.; FLYVBJERG, A.; GOLDSCHMEDING, R. Imbalance of growth factor signalling in diabetic kidney disease: is connective tissue growth factor (CTGF, CCN2) the perfect intervention point? **Nephrol Dial Transplant** v. 20, p. 6–10 2004.

ORTEGA-VELAZQUEZ, R. M.; GONZALES-RUBIO, M. P; RUIZ-TORRES, M. L.; DIEZ-MARQUES, M. C.; IGLESIAS, M.; RODRIGUEZ-PUYOL, D.; RODRIGUEZ-PUYOL. Collagen I upregulates extracellular matrix gene expression and secretion of TGF- β 1 by cultured human mesangial cells. **The American Journal of Physiology**, v. 286, p. C1335-C1343, 2004.

PIEK, E.; HELDIN, C. H.; DIJKE, P. Specificity, diversity and regulation in TGF β superfamily signaling. **The FASEB J Journal**, v.13, p. 2105-2124, 1999.

RODRIGUEZ-VITA, J.; SANCHEZ-LOPEZ, E.; ESTEBAN, V.; RUIZ-ORTEGA, M. Angiotensin II activates the Smad pathway in vascular Smooth Muscle Cells by a transforming growth factor- β -independent mechanism. **Circulation**, v. 111, p. 2509-2517, 2005.

WEIGERT, C.; BRODBECK, K.; KLOPPER, H. U.; SCHLEICHER, E. D. Angiotensin II induces human TGF- β 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia. **Diabetologia** v.45, p. 890-898, 2002.

ZHOU, G.; LI, C.; CAI, L. Advanced Glycation End-Products Induce Connective Tissue Growth Factor-Mediated Renal Fibrosis Predominantly through Transforming Growth Factor- β Independent Pathway. **American Journal of Pathology**, v. 165, No. 6, 2004.

ANEXOS

ANEXO 1 O GRUPO SANOFI AVENTIS

Toda a parte experimental deste trabalho junto ao grupo Sanofi Aventis, de agosto de 2006 a janeiro de 2007. Este grupo está presente em mais de 100 países, através de suas atividades de pesquisa, desenvolvimento, industriais e comerciais. Com um montante de 27 milhões de euros Sanofi Aventis é número 1 da Indústria Farmacêutica na Europa e França e número 3 mundial.

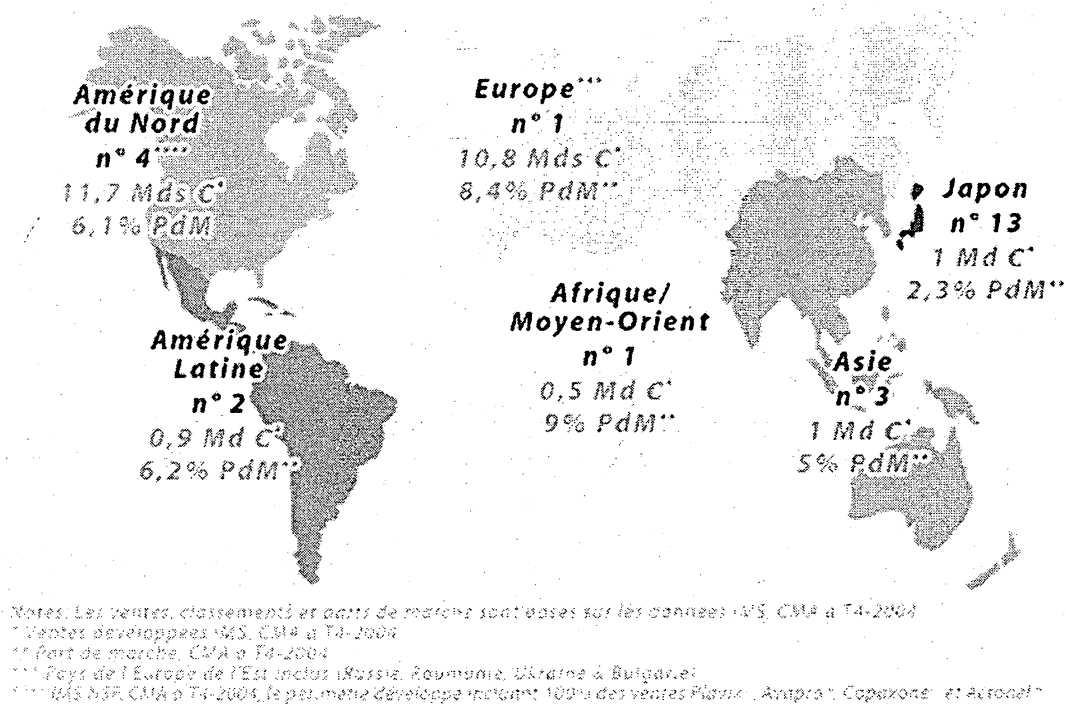


Figura 1: Repartição do montante de negócios e de partes de mercado de Sanofi Aventis no mundo.

Em 31 de dezembro de 2005, o grupo Sanofi Aventis conta com 97181 colaboradores :

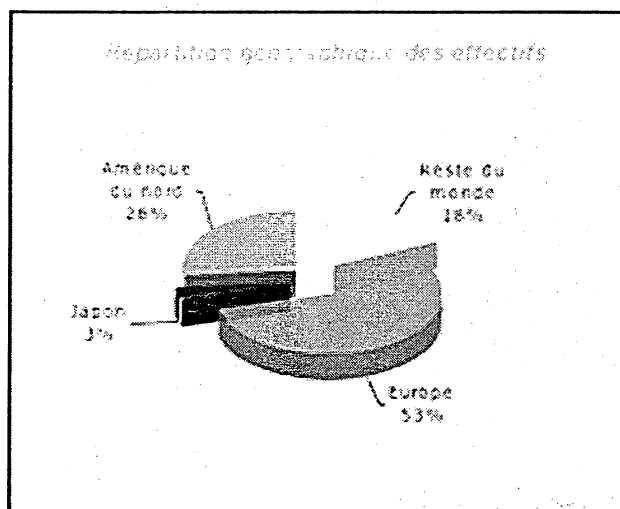


Figura 2: Repartição dos efetivos.

O capital de Pesquisa e Desenvolvimento do grupo ultrapassa 4 milhares de euros e se situa entre os 3 primeiros da indústria farmacêutica mundial. São mais de 17191 pesquisadores mobilizados para conceber novos medicamentos.

Sanofi aventis se apóia em uma pesquisa de classe mundial para desenvolver posições de primeiro plano nos 7 domínios terapêuticos maiores:

- ✓ Cardiovascular
- ✓ Trombose
- ✓ Sistema Nervoso Central
- ✓ Oncologia
- ✓ Doenças Metabólicas
- ✓ Medicina Interna
- ✓ Vacinas

A pesquisa tem por objetivo descobrir e propor novos alvos promissores a serem desenvolvidos e fornecer o suporte científico para seu estudo. Sanofi Aventis optou por uma organização por projeto ao longo do desenvolvimento de moléculas, da fase pré-clínica (estudos farmacológicos e toxicológicos em animais) até sua inserção no mercado. Esta organização garante a coerência e a continuidade do desenvolvimento, favorisa a otimização dos meios e a diminuição dos prazos. Ela permite a transmissão de uma avaliação englobando

todas as atividades de diferentes departamentos, da pesquisa ao marketing. Esta organização por projeto se apoia em uma estrutura de planejamento central forte.

O Departamento Cardiovascular

O departamento cardiovascular está dividido em dois locais : Frankfurt e Chilly-Mazarin. O campus Chilly-Mazarin possui 1086 assalariados que exercem os seguintes domínios :

funções suporte, pesquisas, fases pré-clínica e clínica, farmacovigilância.

O campus está dividido em 3 atividades :

- ✓ Química : concepção e síntese de moléculas químicas dirigidas contra alvos de interesse terapêutico.
- ✓ Bioquímica : Validação de alvos, criação de testes High Throughput Screening, estudos de proteínas *in vitro*.
- ✓ Farmacologia: estudo em modelos animais do efeito de moléculas químicas sintetizadas e validadas na Bioquímica.

Este estágio se desenvolveu no campus Chilly-Mazarin no grupo Bioquímica 2, dirigido pelo Dr. Philippe Beauverger e na unidade dirigida pelo Dr. Stéphane Illiano. As principais atividades do grupo são :

- ✓ Biologia Molecular e Celular: clonagem, estabelecimento de linhagens estáveis, construções de plasmídeos, transfecções...
- ✓ Bioquímica : purificação de proteínas recombinantes, expressão de proteínas em sistemas celulares, testes enzimáticos, testes de interações proteína-proteína...
- ✓ O screening : "Middle Throughput Screening" ou M.T.S : passagem, em testes biológicos, de quimiotecas, de 16 000 a 100 000 compostos.

Histórico

1970: Criação de Synthélabo pela fusão de laboratórios Dausse (fundados em 1834) e dos laboratórios Robert & Carrière (fundados em 1899)

1973: Criação de Sanofi por Elf Aquitaine.

L'Oréal adquire Synthélabo

Compra do ramo farmacêutico do grupo Clin Midy Industries por Sanofi

1978: Sanofi lança Ticlid®

1980 : Fusão de Synthélabo com Métabio-Joullié

1988 : Synthélabo lança 2 medicamentos : Stilnox® et Xatral®

1991 : Aliança de Sanofi com Sterling Winthrop, grupo farmacêutico americano.

1992 : Aquisição por Synthélabo dos laboratórios Delagrangue e laboratórios Delalande.

1993 : Integração dos laboratórios Goupil a Synthélabo.

1994 : Sanofi entra no mercado americano com aquisição de atividade de medicamentos de prescrição de Sterling Winthrop, filial de Easman Kodak.

1999 : Fusão dos grupos Sanofi e Synthélabo.

Rhône-Poulenc e Hoechst criam Aventis.

1999/2002 : Crescimento importante de produtos do grupo : Stilnox®, Plavix®, e Aprovel® por Sanofi-Synthélabo ; Lovenox®, Allegra®, e Taxotere® por Aventis.

2002/2003 : Aumento de potência de Sanofi-Synthélabo no mercado americano com seis autorizações de entrada no mercado.

2004 : Aquisição e após fusão por Sanofi-synthélabo de Aventis para criar Sanofi Aventis.

ANEXO 2

ANEXO 2 TRABALHOS PUBLICADOS

PAMPLONA, J.H.; ARAÚJO, R.L.F.; SALLES, H.M.R.; KISS, A.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.C. Suplementação Crônica com óleo de peixe em ratas apresenta efeito antidepressivo. Anais da FeSBE 2005 –Federação de Sociedades de Biologia Experimental- Águas de Lindóia-SP, 24 a 27 de agosto de 2005, pág.96

ARAÚJO, R.L.F.; PAMPLONA, J.H.; SALLES, H.M.R.; KISS, A.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.C. Efeito antidepressivo do óleo de peixe em ratos adultos suplementados durante os períodos de gestação e lactação. Anais da FeSBE 2005 –Federação de Sociedades de Biologia Experimental- Águas de Lindóia-SP, 24 a 27 de agosto de 2005, pág.97

NALIWAIKO, K.; SALLES, H.M.R.; KISS, A.; ARAÚJO, R.L.F.; PAMPLONA, J.H.; FERRAZ, A.C. Suplementação crônica com óleo de peixe apresenta efeito antidepressivo, mesmo quando ocorre após o período crítico do desenvolvimento cerebral. Anais da FeSBE 2005 –Federação de Sociedades de Biologia Experimental- Águas de Lindóia-SP, 24 a 27 de agosto de 2005, pág. 179

PAMPLONA, J.H.; ARAÚJO, R.L.F.; SALLES, H.M.R.; KISS, A.; NALIWAIKO, K.; FERRAZ, A.C. Efeito antidepressivo do óleo de peixe em ratas F1. 13º Evento de iniciação científica- 13ºEVINCI da Universidade Federal do Paraná, 05 a 07 de outubro de 2005, pág. 134

ARAÚJO, R.L.F.; NALIWAIKO, K.; KISS, A.; SALLES, H.M.R.; PAMPLONA, J.H.; FERRAZ, A.C. Efeito antidepressivo do óleo de peixe em ratos adultos suplementados durante os períodos de gestação e lactação. 12º Evento de iniciação científica- 12ºEVINCI da Universidade Federal do Paraná, 13 a 15 de outubro de 2004, pág. 44